



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A. C.**

**“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y CINÉTICA DE LA  
LACTATO DESHIDROGENASA 2 -LDH-2-  
RECOMBINANTE DEL CAMARÓN BLANCO  
*Litopenaeus vannamei*”**

---

Por

AMBAR AZENETH FREGOSO PEÑUÑURI

TESIS APROBADA POR LA


COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

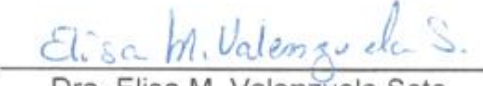
MAESTRIA EN CIENCIAS

## APROBACIÓN


Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Ambar Azeneth Fregoso Peñuñuri, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.

  
M. en C. Alma Beatriz Peregrino Uriarte  
Director de Tesis

  
Dra. Gloria Yepiz Plascencia  
Asesor

  
Dra. Elisa M. Valenzuela Soto  
Asesor

  
M. en C. Ciria Figueroa Soto  
Asesor

  
Dr. José Soñanez Organis  
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

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** –CONACYT-, por el financiamiento aportado para la realización de este trabajo de investigación y por la beca de manutención que me otorgó para la realización de mis estudios de maestría.

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C** –CIAD- por haberme aceptado para la realización de mis estudios de maestría y haberme permitido el uso de sus equipos e instalaciones para la realización exitosa de este trabajo.

Al **proyecto No. 221240** de CONACYT por el financiamiento para la ejecución de este trabajo.

A la **M.C. Alma B. Peregrino**, muchas gracias por haberme aceptado como su alumna, por su apoyo incondicional, ayudarme y preocuparse por mi todo este tiempo, por su paciencia (muy importante) y porque me trato como una tercera hija. De todo corazón muchas gracias.

A la **Dra. Gloria Yepiz**, por abrirme las puertas desde un principio como practicante y después como alumna de maestría, gracias por ayudarme a comenzar mi camino por la ciencia. Gracias por su confianza, apoyo y conocimientos, y por creer en mí.

A la **M.C. Lilia Leyva**, por su apoyo técnico en la sobreexpresión y purificación de la proteína LDH-2, por TODOS los consejos, por todas las pláticas, las enseñanzas, todo el apoyo incondicional (dentro y fuera del laboratorio), muchísimas gracias por hacer mi vida más fácil.

A mi comité de tesis integrado por la **M.C. Alma Beatriz Peregrino Uriarte, Dra. Gloria Yepiz Plascencia, Dra. Elisa Miriam Valenzuela Soto, M.C. Ciria Figueroa Soto y Dr. José Guadalupe Soñanez Organis**, por toda la ayuda y conocimientos brindados.

A la **Dra. Elisa Valenzuela** y a la **M.C. Ciria Figueroa** por permitirme trabajar en su laboratorio de Proteínas de Resistencia al Estrés, por todas sus enseñanzas y apoyarme a lo largo de todo el proyecto y claro, por mostrarme que tan maravillosas son las enzimas.

A mis más que compañeros, amigos del laboratorio. **Keni Cota** (Kenis), **José Alfredo Martínez** (Joseph), **Monserath Felix**, **Dahlia Nuñez**, **Dulce Caraveo**, **Fer Delgado**. Por todas las alegrías y muy buenos momentos que pasamos, así como toda la ayuda que me brindaron.

A mis amigos, **Ana Lafarga**, **Mildren Porchas**, **Luz Vázquez**, **Gioberti Catalan**, **Hector Parra**, **Kazz Zazueta**, **Fabrizio Valenzuela** y a todos mis compañeros de CIAD.

A la familia **Campillo Gaona**, porque en tan poco tiempo de conocernos se convirtieron en mi segunda familia. Gracias por alimentarme, darme techo y ayudarme en todo lo que necesitaba.

Y por último, pero no menos importante, a mi familia, a mi mamá **Celina Peñuñuri** por creer tanto en mí y sus sabios consejos, a mi papá **Jesús Fregoso** por que definitivamente si no fuera por él y su amor por la ciencia no estaría aquí, al bebé **Manuel Fregoso** (eres mi hermano favorito) y a mi tía **Flor Peñuñuri** por apoyarme y cuidarme. Sin ustedes no sería la persona que soy hoy.

## DEDICATORIA

*A mi familia,  
Gracias por todo  
Los quiero con todo mi corazón.*

## CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
Lista de Figuras.....	iv
Lista de Tablas.....	vi
Resumen.....	vii
Abstract.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
<b>ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>3</b>
El camarón Blanco y la Hipoxia.....	3
Mecanismos de Adaptación en Respuesta a la Hipoxia.....	5
Metabolismo Energético.....	6
Glucólisis.....	7
Glucólisis Anaeróbica.....	7
Lactato Deshidrogenasa.....	9
Isoenzimas de la Lactato Deshidrogenasa.....	10
En Vertebrados.....	10
En Invertebrados.....	12
Lactato Deshidrogenasa de Camarón Blanco <i>L. vannamei</i> .....	15
El gen LvanLDH.....	15
Composición de las subunidades LDH-1 y LDH-2.....	16
Sobreexpresión de las Subunidades Proteicas LDH-1 y LDH-2.....	17
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>19</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>

## CONTENIDO (Continuación)

	Pág.
Objetivo General.....	20
Objetivos Específicos.....	20
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	21
Sobreexpresión y Purificación de la Subunidad LDH-2 Recombinante.....	21
Transformación de Células Competentes <i>E. coli</i> ER2566.....	21
Cultivos bacterianos e inducción de la sobreexpresión.....	22
Purificación por Cromatografía de Afinidad.....	22
Cuantificación de Proteína.....	24
Ensayos de Actividad Enzimática.....	24
Zimograma para LDH-2 Recombinante.....	24
Espectrofotometría para la Isoenzima Recombinante.....	25
Reducción de piruvato a lactato (Método estándar).....	25
Oxidación de lactato a piruvato (Método estándar).....	25
Estabilidad al pH y pH Óptimo.....	25
Estabilidad a Temperatura y Temperatura Óptima.....	26
Afinidad a Sustrato.....	27
Patrones de velocidad inicial.....	27
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	30
Sobreexpresión de la subunidad de LDH-2 en <i>E.coli</i> ER2566.....	30
La subunidad de LDH-2 recombinante Purificada por Afinidad Quitina.....	32
Zimograma de la LDH-2.....	35
Actividad Enzimática y Caracterización Bioquímica de la LDH-2 Recombinante.....	36
Efecto del pH en la Actividad de la LDH-2.....	36
pH óptimo de la LDH-2.....	36
Estabilidad de la LDH-2 al pH.....	38
Efecto de la Temperatura sobre la Actividad de la LDH-2.....	39



## CONTENIDO (Continuación)

	<b>Pág.</b>
Temperatura óptima.....	39
Estabilidad de la LDH-2 a la Temperatura.....	41
Afinidad a Sustrato de la LDH-2.....	42
Determinación de las constantes cinéticas $K_m$ y $V_{max}$ .....	43
<b>CONCLUSIONES</b> .....	49
<b>REFERENCIAS</b> .....	50

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Representación gráfica del gen de LDH de <i>L.vannamei</i> .....	<b>15</b>
<b>Figura 2.</b> Comparación de las subunidades LDH-A y LDH-B de humano y las subunidades de LDH-1 y LDH-2 de <i>L.vannamei</i> .....	<b>17</b>
<b>Figura 3.</b> PCR de la transformación de las colonias de <i>E. coli</i> ER2566 con el plásmido recombinante de LDH-2.....	<b>30</b>
<b>Figura 4.</b> Sobreexpresión de la subunidad proteica de LDH-2. ....	<b>31</b>
<b>Figura 5.</b> Geles de la subunidad de LDH-2 recombinante durante el proceso de purificación .....	<b>33</b>
<b>Figura 6.</b> LDH-2 recombinante pura.....	<b>34</b>
<b>Figura 7.</b> Zimograma de la LDH-2 recombinante purificada.....	<b>35</b>
<b>Figura 8.</b> Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la LDH-2 recombinante de <i>L. vannamei</i> .....	<b>36</b>
<b>Figura 9.</b> Cambios en la actividad de LDH-2 recombinante de <i>L. vannamei</i> en función al pH.....	<b>37</b>
<b>Figura 10.</b> Estabilidad de la LDH-2 recombinante de <i>L. vannamei</i> al pH.....	<b>39</b>
<b>Figura 11.</b> Efecto de la temperatura en la actividad enzimática de la LDH-2 recombinante de <i>L.vannamei</i> .....	<b>40</b>
<b>Figura 12.</b> Estabilidad de la LDH-2 recombinante de <i>L: vannamei</i> , incubada por 1 h a diferentes temperaturas.....	<b>41</b>

## LISTA DE FIGURAS (Continuación)

	<b>Pag.</b>
<b>Figura 13.</b> Patrones de velocidad inicial de la LDH-2 recombinante.....	<b>45</b>
<b>Figura 14.</b> Gráfica de Lineweaver-Burk de los datos de velocidad inicial de la LDH-2 recombinante.....	<b>45</b>
<b>Figura 15.</b> Patrones de velocidad inicial de la LDH-2 recombinante.....	<b>46</b>
<b>Figura 16.</b> Gráfica de Lineweaver-Burk de los datos de velocidad inicial de la LDH-2 recombinante.....	<b>46</b>
<b>Figura 17.</b> Gráfica de Interceptos contra el inverso de la concentración de NADH.....	<b>47</b>
<b>Figura 18.</b> Gráfica de Interceptos contra el inverso de la concentración de piruvato.....	<b>47</b>

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Cuadro de purificación de la LDH-2.....	<b>34</b>
<b>Tabla 2.</b> Actividad específica de la LDH-2 recombinante de <i>L. vannamei</i> utilizando sustratos y coenzimas diferentes.....	<b>43</b>

## RESUMEN

En respuesta a la hipoxia ambiental (baja concentración de oxígeno disuelto en agua) cambia el metabolismo energético del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, activándose la glucólisis anaeróbica. Una de las principales enzimas involucradas en este proceso es la lactato deshidrogenasa (LDH), que cataliza la producción de lactato a partir de piruvato. Se han identificado dos subunidades proteicas de la LDH de *L. vannamei* (LDH-1 y LDH-2), deducidas de diferentes transcritos que provienen de un mismo gen por medio del procesamiento por corte y empalme alternativo mutuamente excluyente, pero no se ha purificado la enzima activa o sus subunidades proteicas y menos aún se ha realizado la caracterización bioquímica y cinética. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue sobreexpresar y purificar la subunidad LDH-2 recombinante de camarón blanco *L. vannamei* para su posterior caracterización bioquímica y cinética. El cDNA de la LDH-2 fue previamente clonado en el vector pTXB1 para producir una proteína de fusión con una región de inteína y un dominio de unión a quitina. La sobreexpresión se realizó en *Escherichia coli* ER2566 y se purificó por cromatografía de afinidad a una matriz de quitina. La asociación de las subunidades de LDH-2 recombinante pura generó una proteína activa llamada LDH-2. La actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente midiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm por la oxidación del NADH durante la reducción del piruvato. Las características bioquímicas y cinéticas se determinaron monitoreando la actividad enzimática a pH y temperaturas variables, así como variando las concentraciones de NADH, piruvato y otros sustratos. La LDH-2 recombinante de *L. vannamei* tiene un pH óptimo de 7.5, es estable al pH entre 7.0 y 8.5, tiene una temperatura óptima de 50 °C, y es estable entre 20 y 50 °C. Se determinaron dos valores de pKa de 9.3 y 6.9 y la energía de activación es de 44.8 kJ/mol\*K. Con base a los patrones de velocidad inicial se calcularon la  $K_m_{\text{NADH}} = 0.57 \pm 0.01$  mM y una  $K_m_{\text{piruvato}} = 5.4 \pm 0.3$  mM y  $V_{\text{max}}$  de 7.4  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína. La proteína nativa tiene una masa molecular de aproximadamente 140 kDa y, por último, se encontró mayor afinidad al piruvato respecto al lactato. Se concluye que la

enzima LDH-2 recombinante de *L. vannamei* posee características bioquímicas similares a la LDH nativa de otros crustáceos, pero tiene diferencias cinéticas.

**Palabras claves:** Lactato deshidrogenasa, caracterización bioquímica, *Litopenaeus vannamei*, cinética enzimática.

## ABSTRACT

In response to environmental hypoxia (low dissolved oxygen concentration in water), a change in the energy metabolism occurs in *Litopenaeus vannamei*, activating anaerobic glycolysis. A key enzyme involved in this process is lactate dehydrogenase (LDH), which catalyzes the production of lactate from pyruvate. Previously two protein subunits deduced from two different transcripts of *L. vannamei* (LDH-1 and LDH-2) were identified and shown that they come from the same gene by processing via mutually exclusive alternative splicing, but the active enzyme or the subunits have not been purified and the biochemical and kinetic characteristics are unknown. Therefore, the aim of this study was to overexpress and purify the recombinant subunit LDHvan-2 of the white shrimp *L. vannamei* for subsequent biochemical and kinetic characterization. In a previous work, LDH-2 cDNA was cloned in the expression vector pTXB1, producing a fusion protein with an intein region and a chitin binding protein. Overexpression was done in *Escherichia coli* ER2566 and the LDH was purified by affinity chromatography to homogeneity using a chitin column. The binding of the subunits LDH-2 form an active protein called LDH-2. The enzyme activity was determined spectrophotometrically measuring the change in absorbance at 340 nm due to the oxidation of NADH during the reduction of pyruvate. The biochemical and kinetic characteristics were determined by monitoring the enzyme activity at varying pH and temperatures as well as varying concentrations of NADH, pyruvate and other substrates. The recombinant LDH-2 has an optimum pH of 7.5, is stable at pH between 7.0 and 8.5, have an optimal temperature of 50 ° C and is stable between 20 and 50 ° C. Furthermore, two pKa of 9.3 and 6.9 were determined, and the activation energy of 44.8 kJ/mol\*K were determined. The initial kinetic velocity constants were calculated, a  $K_m_{\text{NADH}} = 0.57 \pm 0.01$  mM and  $K_m_{\text{pyruvate}} = 5.4 \pm 0.3135$  mM and  $V_{\text{max}}$  of 7.4  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$  of protein. The native protein

showed a molecular mass of approximately 140 kDa molecular. Finally, the LHD2 has higher affinity for piruvate than for lactate. In conclusion, the recombinant LDH-2 enzyme from *L. vannamei* has biochemical characteristics similar to the native LDH from other crustaceans, but has differences in kinetic properties.

**Keywords:** Lactate dehydrogenase, biochemical characterization, *Litopenaeus vannamei*, enzyme kinetics.



## INTRODUCCIÓN

El cultivo de camarón es una actividad económica muy importante a nivel mundial. México se encuentra entre los mayores productores de camarón en el mundo, siendo el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* una de las especies más cultivadas. Sin embargo, factores ambientales como la temperatura, salinidad y cambios en la concentración de oxígeno pueden afectar dicha producción. Al igual que otras, esta especie requiere concentraciones mayores a 2 mg/L de oxígeno disuelto para realizar sus funciones vitales (Villarreal et al., 1994).

El camarón blanco tiene la capacidad de mantener el nivel de oxígeno requerido en el medio interno mediante mecanismos bioquímicos, fisiológicos como la hiperventilación y conductuales como la evasión de áreas con hipoxia (Fanjul, 1998). Pero además, cuando es sometido a bajas concentraciones de oxígeno, cambia su metabolismo energético, activando la glucólisis anaeróbica. La lactato deshidrogenasa (LDH) está involucrada en el cambio del metabolismo y cataliza la producción de lactato a partir de piruvato y viceversa. En *L. vannamei* se conocen dos subunidades de LDH que provienen de un mismo gen y que por procesamiento de corte y empalme alternativo mutuamente excluyente, codifican para una subunidad que predomina en branquias (LDH-1) y otra que predomina en músculo (LDH-2). Ambas subunidades de la LDH tienen un 95% de homología a nivel de aminoácidos (Soñanez-Organis et. al., 2012).

Con la finalidad de estudiar las características bioquímicas de las isoformas de la LDH de *L. vannamei*, anteriormente en nuestro grupo de trabajo se clonaron las secuencias codificantes de ambas subunidades proteicas (LDH-1 y LDH-2), se logró sobreexpresar y se estableció el protocolo de purificación (Ochoa-Valdez, 2012) para la subunidad LDH-2, sin embargo no se han estudiado a detalle.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue caracterizar bioquímica y cinéticamente la LDH-2 de *L. vannamei*, para lo cual se determinaron: la estabilidad al pH y a la temperatura, el pH y la temperatura óptimos, la actividad enzimática, la afinidad a sustrato y los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$ .

## ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

### El Camarón Blanco y la Hipoxia

La acuicultura ha sido reconocida por sus beneficios socioeconómicos así como por su fácil desarrollo. Esta actividad representa uno de los sectores de producción de alimento de mayor crecimiento, gracias al aumento en los volúmenes de su producción y de su valor anual (Montoya-Rodríguez & López-Félix, 2000). El camarón es una de las especies acuáticas más cultivadas a nivel mundial y esta actividad recibe el nombre de camaronicultura. Los países que han contribuido al desarrollo de la camaronicultura son India, China, Estados Unidos, México, Tailandia y Japón (FAO, 2014).

En México, la camaronicultura inició a principios de la década de los 70, cuando se comenzó a desarrollar la tecnología para el cultivo de camarón (FAO, 2014). Así, en nuestro país, el cultivo de camarón es una de las actividades pesqueras de mayor importancia en términos de volumen y empleos generados. El camarón se produce tanto por su captura, como por la acuicultura, y la tasa media de crecimiento anual de la producción en los últimos 10 años es de 6.24%, principalmente por el crecimiento de la camaronicultura (GBC Group, 2011). En 2013, la producción de este crustáceo fue de aproximadamente entre 35,000 y 55,000 toneladas por captura y acuicultura, respectivamente (FAO, 2014). Entre las especies más cultivadas en México se encuentran *Litopenaeus occidentalis*, *Litopenaeus stylirostris* y *L. vannamei*.

El camarón blanco *L. vannamei* es un decápodo de la familia Penaeidae y es nativo de la costa oriental del Océano Pacífico, desde Sonora, al norte de México, hacia Centro y Sudamérica, hasta Tumbes en Perú (FAO, 2006).

Esta especie requiere de ciertas condiciones medioambientales de salinidad, oxígeno disuelto, temperatura, etc., para su adecuado desarrollo y crecimiento.

La disponibilidad de oxígeno disuelto en el agua es una de las propiedades más importantes para el cultivo de peces y una amplia gama de organismos marinos (Yoshikawa et al., 2007). El oxígeno es un sustrato fundamental para todas las funciones metabólicas que sustentan la vida de los organismos aeróbicos (Pérez-Rostro et al, 2004). Se ha demostrado que el oxígeno es un factor ambiental regulador del metabolismo del camarón *Penaeus setiferus* y que participa en la obtención de energía a partir de la respiración, por la vía de la fosforilación oxidativa (Rosas et al., 1999). En la mayoría de los organismos aerobios, el oxígeno es el último aceptor de electrones de la cadena respiratoria, lo que le permite a los organismos aprovechar al máximo la energía contenida en las moléculas metabolizadas por el ciclo de Krebs. Por lo anterior, una reducción del oxígeno disuelto de 5 a 4 mg/L provoca una disminución de hasta un 25% en la energía canalizada hacia la producción de biomasa (Rosas et al., 1999). Por ello, en el cultivo de camarón este parámetro influye directamente en su crecimiento y desarrollo (Zenteno-Savín et al., 2006).

Los niveles normales de oxígeno disuelto (normoxia) para cultivos de camarón, oscilan entre 6 y 8 mg/L (Brouwer et al., 2007). No obstante, los cultivos de camarón pueden presentar episodios de baja concentración de oxígeno o hipoxia (Rosas et al., 1999). La hipoxia se define como una concentración menor de 2.8 mg/L de oxígeno disuelto (Díaz & Rosenberg, 1995) y este es uno de los principales factores de estrés en los ecosistemas marinos como resultado de la interacción de diversos factores ambientales (Brown-Peterson et al., 2008).

La hipoxia puede ser un fenómeno natural causado por la estratificación (haloclinas y termoclinas) (Rosenberg et al., 1991). Además, la hipoxia es favorecida por la excesiva entrada de nutrientes antropogénicos y de materia orgánica en el agua, así como por el aumento de mareas y vientos (Wu, 1999). Hoy en día la hipoxia o anoxia (sin oxígeno) afecta miles de kilómetros cuadrados de aguas marinas (Wu, 1999)

causando problemas ecológicos importantes como la mortalidad masiva de peces y otros animales marinos, defaunación de las poblaciones bentónicas y la disminución de la producción de la pesca (Lu & Wu, 2000). Algunos sistemas marinos tienen cambios de agua extremadamente limitados y una excesiva cantidad de nutrientes antropogénicos, por lo que el agua que se encuentra en la parte más profunda presenta un estado de hipoxia o anoxia permanente (Lu & Wu, 2000).

La concentración mínima de oxígeno disuelto ocurre cerca del amanecer en los estanques de cultivo, debido a la actividad respiratoria de los camarones y su sobrepoblación, así como por los microorganismos que también habitan el estanque (Boyd, 1989). La condición de hipoxia influye directamente sobre el crecimiento, la supervivencia, la alimentación, la muda, la conducta, la capacidad de osmoregulación (Cheng et al., 2003), y la respuesta inmune de los peneidos (Hill et al., 2004). La hipoxia no controlada puede llegar a ser letal, ya que repercute en múltiples formas y niveles en un organismo (Wu, 2002).

### Mecanismos de Adaptación en Respuesta a la Hipoxia

Los crustáceos son capaces de sobrevivir bajo diferentes periodos de hipoxia ya que han desarrollado adaptaciones que les permiten subsistir en esas condiciones de estrés (Burnett & Stickle, 2001). Por ejemplo, el camarón gamba *Crangon crangon* y el anfípodo *Corophium arenarium* (Gamble, 1971) tienen sistemas de detección de oxígeno que les indica cuándo migrar a zonas donde la concentración de oxígeno es favorable (Zhang et al., 2006).

A pesar de que existen organismos con la habilidad de detectar hipoxia, no siempre pueden evitarla. En este caso, los organismos deben contar con mecanismos de adaptación que les permitirán continuar con las funciones vitales. La regulación de metabolismo es una respuesta metabólica y fisiológica que adoptan los crustáceos en respuesta a la hipoxia (Hochachka et al, 1996). Los organismos oxiconformadores reducen la demanda de oxígeno en respuesta al nivel de oxígeno del ambiente. Por

ejemplo, el molusco *Metulus edulis* modula su consumo de oxígeno en base a la disponibilidad en el ambiente. En cambio, los oxireguladores como el molusco *Argopecten irradians*, mantienen el consumo de oxígeno independiente de los niveles de oxígeno en el medio (Herreid, 1980).

La hiperventilación es otro mecanismo de respuesta a la hipoxia, en donde la capacidad respiratoria del organismo aumenta, permitiéndole extraer la mayor cantidad de oxígeno posible del agua y transportarlo a los tejidos (Chang-Dong & Zhen-Hua, 2013). Por ejemplo, la trucha arcoíris *Salmo gairdneri* aumenta su capacidad respiratoria hasta 13 veces en branquias (Holeton & Randall, 1967), mientras que el camarón blanco, regula la presión de la hemolinfa en las branquias permitiéndole transportar una mayor cantidad de oxígeno (Kinne, 1970).

Los crustáceos tienen la capacidad de sobrevivir durante largos periodos en hipoxia (>1400 h) (Gray et al., 2002). Cuando *L. vannamei* se encuentra en un ambiente donde la concentración de oxígeno es baja, cambia su metabolismo a anaeróbico para satisfacer las necesidades energéticas (Soñanez-Organis et al., 2010). Este mecanismo de adaptación es más drástico en comparación con el mecanismo de hiperventilación (Burnett & Stickle, 2001). Así, el camarón *L. vannamei* sintetiza lactato a partir de piruvato, como producto final de la glucólisis anaeróbica, para obtener energía (Soñanez-Organis et al., 2010).

### Metabolismo Energético

El metabolismo es un conjunto de reacciones bioquímicas que mantienen a la célula con vida y se divide en anabolismo y catabolismo. El anabolismo está implicado en la síntesis de moléculas orgánicas complejas, mientras que el catabolismo es la degradación de biomoléculas. En el catabolismo, los nutrientes (carbohidratos, lípidos y proteínas) son degradados mediante reacciones oxidativas en productos más sencillos como ácido láctico, ácido acético, amoníaco, urea o CO<sub>2</sub>, produciendo energía (Stryer, 1996). La principal fuente de energía en aves y mamíferos son los

carbohidratos y lípidos. En camarón, los componentes bioquímicos o nutrientes de mayor importancia por su papel estructural, funcional y energético para llevar a cabo procesos fisiológicos son: proteínas, carbohidratos y lípidos (Sánchez-Paz et al., 2006).

## **Glucólisis**

La glucólisis es una vía metabólica casi universal de los seres vivos que convierte un mol de glucosa en dos moles de piruvato, con la producción de cantidades relativamente escasas de ATP. En los organismos aeróbicos, la glucólisis sirve de preámbulo al ciclo del ácido cítrico y a la cadena de transporte de electrones, vías en las que se produce la mayor parte de la energía necesaria para mantener las funciones vitales. En condiciones normales de oxígeno, el piruvato es metabolizado por el ciclo de Krebs, transporte de electrones y fosforilación oxidativa hasta generar CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y ATP (Stryer, 1996).

La secuencia de reacciones, desde la glucosa hasta el piruvato, es prácticamente igual en todos los organismos y en toda clase de células, sin embargo, el destino del piruvato puede variar dependiendo de la disponibilidad de oxígeno, y puede dar lugar a la formación de etanol, la formación de acetil-coenzima A (acetil-CoA) por descarboxilación oxidativa del piruvato y a la formación de lactato por la reducción del piruvato por la lactato deshidrogenasa (LDH), cuando la cantidad de oxígeno libre es bajo (Stryer, 1996).

## **Glucólisis Anaeróbica**

La glucólisis anaeróbica es inducida como uno de los primeros pasos para producir ATP en condiciones de hipoxia. Se ha demostrado que en esta condición, los crustáceos satisfacen sus necesidades de energía mediante esta vía con la acumulación de lactato como producto final (Racotta et al., 2002). En el camarón

rayado *Palaemon elegans* (Taylor & Spicer, 1987), la cigala *Nephrops norvegicus* (Hagerman et al., 1990), la langosta *Cherax destructor* (England & Baldwin, 1985), el camarón tigre *Penaeus monodon* (Paterson, 1993) y en el cangrejo *Neohelice granulata* (Geihs et al., 2010) se detectó una acumulación de lactato a bajas concentraciones de oxígeno. En *L. vannamei*, expuesto a corto y a largo plazo de hipoxia moderada (2-2.6 mg/L DO), los niveles de lactato aumentaron en hemolinfa (Racotta et al., 2002), hepatopáncreas y músculo (Pérez-Rostro et al., 2004, Soñanez-Organis et al., 2010).

En el hombre, la concentración del lactato aumenta generalmente cuando la demanda de energía rebasa la disponibilidad de oxígeno en la sangre (Jacobs, 1986). Bajo estas condiciones, la enzima piruvato deshidrogenasa no logra convertir el piruvato a acetil-CoA lo suficientemente rápido (Stallknecht et al., 1998). Como consecuencia, la glucólisis se inhibe y la producción de ATP disminuye. Para evitar lo anterior, la LDH cataliza la reducción del piruvato a lactato para continuar con la glucólisis y la producción de ATP (Stryer, 1996).

En vertebrados, se sabe que el Factor Inducible por Hipoxia-1 (HIF-1) es el principal activador del gen de la LDH cuando la disponibilidad de oxígeno es baja (Semenza et al., 1996). HIF-1 es un factor de transcripción regulador de la homeostasis de oxígeno que controla cientos de los genes blanco, incluyendo el factor de crecimiento endotelial vascular y las proteínas asociadas con el transporte de la glucosa (GLUTs) y el metabolismo energético (Semenza et al., 1994). Soñanez-Organis y cols. (2010) demostraron la presencia de HIF-1 y mostraron evidencia del papel que juega durante la hipoxia en el camarón blanco. La acumulación de lactato en los tejidos del camarón después de una exposición a hipoxia, revela la participación de la LDH y el cambio de metabolismo para la obtención de energía y mantener las funciones vitales. El silenciamiento de HIF-1, mediante RNA de doble cadena, desacelera la glucólisis anaeróbica de manera tejido-específica en *L. vannamei* expuesto a la hipoxia, aportando evidencia de que HIF-1 está involucrado en la inducción de la glucólisis anaeróbica (Soñanez-Organis et al., 2010).



## Lactato Deshidrogenasa

La LDH (E.C. 1.1.1.27) cataliza la conversión reversible entre el piruvato y el lactato. La formación de lactato consume  $\text{NADH}^+$  y genera  $\text{NAD}^+$ . La LDH es principalmente una enzima citosólica, pero también puede estar presente en la mitocondria de algunas células humanas, incluyendo astrocitos (Lemire et al., 2008), células de próstata sanas y cancerosas (De Bari et al., 2010), en células de carcinoma hepatocelular (Pizzuto et al., 2012) y en células sanas y cancerosas de mama (Hussien & Brooks, 2011). Aunque se ha reportado la inmunodetección de la LDH en preparaciones mitocondriales de músculo esquelético humano (Dubouchaud et al., 2000), no se ha confirmado su ubicación mitocondrial (Rasmussen et al., 2002).

La LDH tiene un peso molecular de aproximadamente 140 kDa y está compuesta por cuatro subunidades, cada una de aproximadamente 35 kDa que dan lugar a un tetrámero (Mulkiewicz et. al, 2000). En humanos se conocen tres tipos de subunidades: M (LDHA), H (LDHB) y X (LDHC), las cuales presentan pequeñas diferencias en sus secuencias de aminoácidos. La asociación de estas subunidades da lugar a la formación de diferentes isoenzimas. Estructuralmente la LDH es muy similar entre especies, sin embargo las secuencias de aminoácidos en vertebrados y nemátodos contienen 20 residuos extras hacia el extremo aminoterminal en comparación con las bacterianas (Tsoi & Li, 1994).

## Isoenzimas de la Lactato Deshidrogenasa

Las isoenzimas son proteínas con diferente estructura pero que catalizan la misma reacción. Comúnmente, estas proteínas son oligómeros de diferentes cadenas peptídicas y normalmente se diferencian en los mecanismos de regulación y en sus propiedades cinéticas. Fisiológicamente, son enzimas con diferentes características estructurales, bioquímicas y cinéticas de acuerdo al tejido en el que se encuentran. Si las cadenas son idénticas, la isoenzima resultante es un homopolímero, y si son diferentes un heteropolímero (Mathews & Van Holde, 1999). La LDH pertenece a una

familia de proteínas conservadas y se han utilizado como modelo para investigar la evolución molecular de las isoenzimas (Markert et al., 1975). Así como otras enzimas, las isoenzimas de la LDH brindan información acerca de las bases bioquímicas y genéticas, ya que da un indicio del grado de complejidad del metabolismo y son una herramienta clave para la identificación taxonómica de las especies (Whit, 1981).

## **En Vertebrados**

En el hombre, la enzima lactato deshidrogenasa es una molécula compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas. Las subunidades son codificadas por tres loci independientes llamadas LDH-A o M (presente en músculo), LDH-B o H (presente en corazón) y LDH-C o X (presente en testículo) (Shoei-Lung, 1998). Las subunidades M (A) y H (B) están codificadas por dos genes diferentes, LDH-M (LDH-A) y LDH-H (LDH-B), respectivamente. El locus de LDH-A humano está situado en el brazo corto del cromosoma 11, mientras que el locus de LDH-B se encuentra en el brazo corto del cromosoma 12 (Mayeda et al., 1974). El gen que codifica para la isoenzima específica de testículos (LDH-C) está ubicado en el cromosoma 11p15.3-p15.5, cerca de la región donde el gen LDH-A reside. Este gen solo se transcribe en células del epitelio germinal y está involucrado en el desarrollo de los testículos y en la espermatogénesis (Edwards et al., 1989).

La subunidad LDH-A y la subunidad LDH-B están formadas por 332 aminoácidos y son semejantes en un 75% con aproximadamente 83 aminoácidos diferentes (Shoei-Lung, 1998). Las subunidades M y H pueden asociarse entre sí o independientemente para formar tetrámeros, que dan lugar a cinco diferentes isoenzimas. La isoenzima LDH-1, LDH-B o LDH-H (tipo de corazón) está formada por cuatro subunidades de B (H) (B<sub>4</sub> o H<sub>4</sub>). LDH-5, LDH-A o LDH-M (tipo de músculo) está compuesta por cuatro subunidades A (M) (A<sub>4</sub> o M<sub>4</sub>). Las otras tres isoformas son LDH-2, resultando de una combinación de tres subunidades B y una de A (B<sub>3</sub>A o

H3M); LDH-3, compuesta por dos subunidades B y dos de A (B2A2 o H2M2); y LDH4 formada por una subunidad B y tres de A (BA3 o HM3) (Yoshida et al., 1966).

A mayor número de subunidades M sobre H, la isoenzima de LDH se vuelve más eficiente en la catálisis para reducir el piruvato a lactato. Mientras que a mayor número de las subunidades H sobre M se favorece la oxidación de lactato a piruvato. Por lo tanto, la LDH-5 (tipo de músculo) favorece la conversión de piruvato a lactato, mientras que la LDH-1 (tipo de corazón) impulsa preferentemente la reacción hacia la producción de piruvato, que más tarde será oxidado y predomina en tejidos ricos en oxígeno (Bittar et al., 1996; Le et al., 2010).

En las células cerebrales humanas incluyendo el hipocampo y la corteza occipital, la isoenzima LDH-1 se encuentra presente tanto en astrocitos como en neuronas, mientras que la LDH-5 está localizada exclusivamente en los astrocitos. Por lo tanto, las neuronas poseen sólo la isoenzima LDH-1, mientras que los astrocitos poseen tanto la LDH-1 y LDH-5. Este patrón de isoenzimas de LDH puede sugerir que la glucólisis para formar lactato (impulsado por la acción de LDH-5) se lleva a cabo en astrocitos durante la activación cerebral mientras que la conversión de lactato a piruvato por la LDH-1 para la oxidación subsiguiente se produce en las neuronas (Bittar et al., 1996).

En peces teleósteos, las isoenzimas LDH-A (LDH-2), LDH-B (LDH-1) y LDH-C (formada por 4 subunidades C) predominan en el músculo, corazón y ojo, respectivamente (Klose, 1969, Markert, 1975). Aunque hay excepciones, por ejemplo en los *Cypriniformes* o *Pleuronectiformes*, la actividad de LDH-B está restringida solo al ojo y al cerebro. En el pez *Gasterosteus aculeatus* la isoenzima LDH-B se ha encontrado solo en el cerebro (Rooney & Ferguson, 1985). En cuanto a las propiedades cinéticas. La LDH-B<sub>4</sub> y LDH-C<sub>4</sub> de los teleósteos presentan un valor bajo para  $K_m$  de piruvato y baja actividad específica (Mulkiewicz, 2000).

Las isoenzimas de LDH difieren en sus propiedades bioquímicas y cinéticas. Gay y cols. (1968) reportaron un pH óptimo que oscila entre 7.2 y 7.4 para todas las isoenzimas de LDH de humano a una temperatura de 30°C cuando la reacción se

lleva a cabo de piruvato a lactato y un pH óptimo que va desde 8.3 a 8.88 cuando hay una oxidación de lactato a piruvato. Drent y cols. (1996) publicaron que el pH óptimo de la LDH de humanos oscila de 7.4 a 7.8 cuando la reacción se lleva a cabo de piruvato a lactato y de 8.8 a 9.8 cuando el lactato es oxidado.

## **En Invertebrados**

La LDH en invertebrados no se encuentra tan bien caracterizada en comparación con la de vertebrados. Usualmente la LDH activa se presenta en forma de tetrámero pero también se ha encontrado en forma dimérica (Eichner & Kaplan, 1977). En crustáceos como *Palaemon serratus* (Thebault et al., 1981) y *Artemia salina* (Ewing & Clegg, 1972) la LDH es una proteína tetramérica de 140 kDa. En la langosta americana *Homarus americanus* la LDH es muy similar a la de vertebrados ya que está codificada por dos genes que dan lugar a la formación de dos tipos de subunidades que al combinarse forman cinco isoenzimas. Las cinco isoenzimas de este crustáceo se distribuyen en la cola (LDH-4 y LDH-5), patas (LDH-1 y LDH-2), cerebro y corazón (LDH-1, LDH-2, LDH-3, LDH-4 y LDH-5). La isoenzima que se encuentra en la cola puede estar activa en forma de dímero o tetrámero dependiendo de las condiciones iónicas (Eichner & Kaplan, 1977).

La LDH presente en crustáceos como el cangrejo de río *Orconectes limosus*, es representada por un único sistema de gen-enzima (Zietata et al., 1996), pero se han encontrado isoformas de la LDH en la langosta americana *Homarus americanus* (Eichner & Kaplan, 1977), el cangrejo gigante *Paralithodes camtschatica* (Mulkiewicz, et al., 2001), el krill nortño *Meganyctiphanes norvegica* (Sundt & Fevolden, 1996), el krill antártico *Euphasia superba* (Fevolden & Schneppenheim, 1988) y el cangrejo de nieve *Chionoecetes opilio* (Angers et al., 1994).

Mulkiewicz y cols. (2001), reportaron dos isoenzimas de LDH (LDH-A<sub>4</sub> y LDH-B<sub>4</sub>) en el músculo abdominal del krill nortño *Meganyctiphanes norvegica*, cinéticamente similares a la LDH de corazón y músculo de vertebrados. La LDH de la cola de la langosta es similar a la LDH-B de vertebrados y la LDH de las patas es análoga a

LDH-A (Eichner & Kaplan, 1977). Algunos organismos poseen solo una isoforma de la LDH, que se adapta al metabolismo aeróbico y anaeróbico. Por ejemplo, la LDH presente en *Palaemon serratus* puede funcionar como isoenzima de tipo M4 o de tipo H4 de acuerdo a la temperatura del ambiente que lo rodea (Thebault, 1983). Las propiedades bioquímicas de la LDH en invertebrados han sido mucho menos estudiadas en comparación con la de vertebrados, pero diversos estudios han demostrado similitudes entre estas dos tipos de organismos.

Mulkiewicz y cols. (2001) reportaron los perfiles de pH para la reducción de piruvato y la oxidación de lactato de LDH-A<sub>4</sub> y LDH-B<sub>4</sub> del krill del norte y LDH-A del krill antártico. En la reducción de piruvato el pH óptimo es de 7.4 y 7.2 para LDH-A<sub>4</sub> y LDH-B<sub>4</sub>, respectivamente, similares a los de la LDH de humano (Gay et al., 1968). Para la oxidación de lactato, el pH óptimo oscila entre 9.0 y 10.5 para LDH-A<sub>4</sub> y entre 8.5 y 9.5 para LDH-B<sub>4</sub>. En el krill antártico, la LDH presentó un pH óptimo de 7.5 para la reducción de piruvato y entre 9.5 y 10.5 para la oxidación de lactato. Sin embargo, las características bioquímicas entre crustáceos pueden variar. Mulkiewicz y cols. (2000) reportaron que para la reducción de piruvato, el pH óptimo de la LDH del crustáceo *Saduria entomon* es de 6.5, muy por debajo del pH descrito para el krill antártico y del norte.

La temperatura óptima de la LDH es otra de las propiedades bioquímicas que varía entre crustáceos. La LDH-B del krill del norte es estable a 40°C, pero a 45°C comienza a perder su actividad enzimática y a 55°C era completamente inactiva. En comparación, la LDH-A del krill del norte es más activa y estable a 50°C (Mulkiewicz et al., 2001). Resultados semejantes presenta la LDH-A del krill antártico, siendo activa y estable a 50°C, perdiendo toda su actividad a los 62°C (Mulkiewicz et al., 2001).

En casi todos los vertebrados, la LDH muestra especificidad por tejido, lo cual es consistente con sus diferencias catalíticas. La isoenzima LDH-A<sub>4</sub> es cinéticamente adecuada para la reducción del piruvato en tejidos anaeróbicos (músculo), mientras que la isoenzima LDH-B<sub>4</sub> es superior en los tejidos aeróbicos (corazón) oxidando el lactato. En el músculo abdominal de *M. norvegica*, las dos isoenzimas (LDH-A<sub>4</sub> y

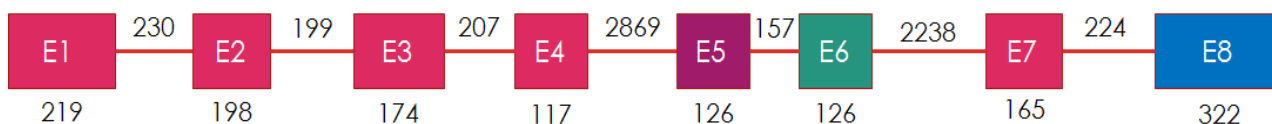
LDH-B<sub>4</sub>) presentes tienen casi la misma actividad enzimática, 294 y 306  $\mu$ moles NADH/min/mg, respectivamente, sin embargo, difieren en su especificidad hacia los sustratos (lactato y piruvato). La existencia de dos tipos de isoenzimas con similar actividad enzimática, diferencias en su estabilidad térmica y pH óptimo, así como su afinidad a sustrato sugiere la presencia de algún mecanismo de adaptación en *M. norvegica* (Mulkiewicz et al., 2001).

La isoenzima LDH-A<sub>4</sub> de *M. norvegica* parece ser más eficiente a bajas concentraciones de piruvato ( $K_m = 0.18$  mM) que LDH-B<sub>4</sub> ( $K_m = 0.36$  mM). Ambas isoenzimas LDH-A<sub>4</sub> y LDH-B<sub>4</sub> tienen una  $K_m$  para lactato de aproximadamente 8 y 25 mM, respectivamente. La LDH-A<sub>4</sub> y la LDH-B<sub>4</sub> de *M. norvegica* no presentan inhibición por lactato por el contrario, si presentan inhibición por sustrato a altas concentraciones de piruvato (Mulkiewicz et al., 2001). En el pez *Orconectes limosus*, la única forma de LDH encontrada en abdomen ( $K_m = 0.82$  mM) y corazón ( $K_m = 0.78$  mM), tiene propiedades cinéticas ( $K_m$ ) similares al heterotetrámero M<sub>2</sub>H<sub>2</sub> de la LDH del músculo esquelético mamíferos ( $K_m = 0.77$  mM) (Scislowski, 1982). Mulkiewicz, y cols. (2000) reportaron para la LDH de *Saduria entomon* una  $K_m$  aparente para piruvato de 0.15 mM a 25 °C.

Las isoenzimas de la LDH de crustáceos tienen una alta variabilidad en sus propiedades cinéticas como resultado de la combinación de las subunidades que las conforman, por ejemplo en *M. norvegica* las isoenzimas de LDH presentan propiedades cinéticas diferentes ( $K_m = 0.18$  mM para LDH-A<sub>4</sub> y  $K_m = 0.36$  mM para LDH-B<sub>4</sub>) (Mulkiewicz et al., 2001). Sin embargo, en camarones peneidos se desconoce la presencia de isoformas de la enzima lactato deshidrogenasa, su estructura y características bioquímicas y cinéticas. Recientemente, Soñanez-Organis y cols. (2012) publicaron la secuencia completa del gen que codifica para la LDH de *L. vannamei* y las secuencias nucleotídicas y deducidas de aminoácidos para las dos subunidades proteicas identificadas.

## El gen LvanLDH

El gen de la LDH de *L. vannamei* (LvanLDH) tiene una secuencia nucleotídica de 7571 pares de bases (GenBank accesión No.JN256027) y codifica para dos transcritos diferentes. LvanLDH está formado por siete intrones; los primeros seis se encuentran en la región codificante, mientras que el intrón número siete está en la región 3'-UTR, separando al exón no codificante número ocho del último exón codificante (Figura 1) (Soñanez-Organis et al., 2012).



**Figura 1.** Representación gráfica del gen de la LDH de *L. vannamei*. Ubicación de los exones (E1-E8) e intrones y sus longitudes en pares de bases. Los cuadros de color verde (E6) y morado (E5) representan los exones variantes; y el cuadro azul (E8) indica el exón no codificante (modificado de Soñanez-Organis et al., 2012).

LvanLDH tiene dos exones mutuamente excluyentes (E5 y E6), que producen dos secuencias codificantes o mensajes diferentes para cada subunidad de la LDH. Los exones E5 (posición 4214-4339) y E6 (posición 4497-4622) codifican para un segmento de 42 aminoácidos. El transcrito primario es procesado por medio de un corte y empalme alternativo mutuamente excluyente (splicing alternativo) para generar los transcritos de cada una de las subunidades LDH-1 y LDH-2 (Figura 2). LDH-1 y LDH-2 tienen un marco de lectura abierto de 999 pb que codifica para 332 residuos de aminoácidos y una subunidad proteica de 36 kDa en donde solo varían 15 aminoácidos (Soñanez-Organis et al., 2012).

Con respecto a la expresión, se detectó que es tejido-específica. El transcrito de la subunidad LDH-1 predominó en los tejidos de branquias, hemocitos y

hepatopáncreas de *L. vannamei*, mientras que LDH-2 se expresa principalmente en el tejido muscular (Soñanez-Organis et al., 2012).

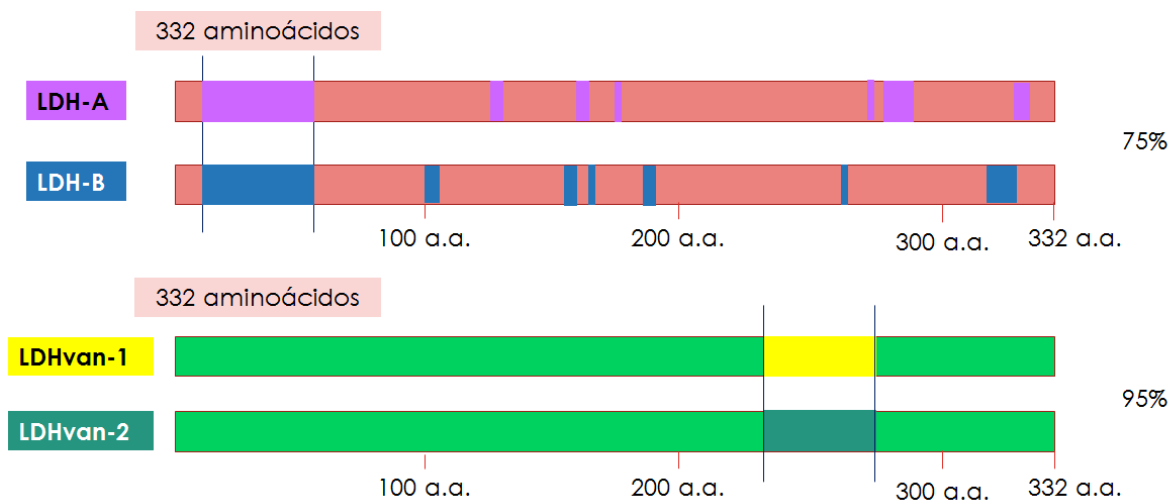
### **Composición de las subunidades de LDH-1 y LDH-2**

Las subunidades deducidas LDH-1 y LDH-2 tienen un peso molecular igual al de las subunidades LDH-A (No. acceso GenBank NG008185) y LDH-B (No. acceso GenBank NG017038.1) de humano. En las subunidades de LDH, los aminoácidos distintos se encuentran localizados en la mitad hacia extremo carboxilo, por el contrario de las LDH de humano donde sus diferencias radican principalmente hacia el extremo amino terminal. Contrastando con LDH de humano, las secuencias de LDH-1 y LDH-2 tienen un 95% de identidad entre sí, mientras que las LDH-A y LDH-B tienen un 75% de identidad entre ellas.

Las siguientes diferencias se encontraron entre las secuencias deducidas de aminoácidos: LDH-1 presenta Ile<sup>241</sup>, Leu<sup>244</sup>, Leu<sup>254</sup>, Val<sup>256</sup>, Ser<sup>258</sup>, Val<sup>260</sup>, Ser<sup>261</sup>, Ser<sup>262</sup>, Val<sup>264</sup>, Lys<sup>265</sup>, Met<sup>267</sup>, Ala<sup>269</sup>, Cys<sup>270</sup>, Val<sup>275</sup> y Ala<sup>276</sup>. En contraste, LDH-2 tiene los siguientes aminoácidos, Val<sup>241</sup>, Met<sup>244</sup>, Thr<sup>254</sup>, Cys<sup>256</sup>, Val<sup>258</sup>, Thr<sup>260</sup>, Arg<sup>261</sup>, Ala<sup>262</sup>, Leu<sup>264</sup>, Thr<sup>265</sup>, Gln<sup>267</sup>, Thr<sup>269</sup>, Val<sup>270</sup>, Thr<sup>275</sup> y Ser<sup>276</sup> (Soñanez-Organis et al., 2012).

La simetría y la expresión de los exones 5 y 6 de LvanLDH, sugieren que ambas subunidades son funcionales en los tejidos de camarón. Las secuencias de LDHvan-1 y LDHvan-2 son similares a nivel de aminoácidos en un 70% a las LDH de la abeja *Nasonia vitripennis* (No. acceso GenBank XP\_001600217) y de la mosca *Drosophila melanogaster* (No. acceso GenBank AAB07594). También se encontraron identidades de un 69% con la LDH del mosquito *Culex quinquefasciatus* (No. acceso GenBank XP\_001866924) y un 66% con los crustáceos *Daphnia magna* (No. acceso GenBank ACN51907) y *Daphnia pulex* (No. acceso GenBank gi 230172), demostrando que estas dos subunidades son muy conservadas entre estas especies (Soñanes-Organis, 2012).





**Figura 2.** Comparación de las subunidades LDH-A y LDH-B de humano y las subunidades de LDH-1 y LDH-2 de *L. vannamei*. Los colores diferentes muestran las diferencias entre cada subunidad.

En cuanto a las isoformas activas de la LDH de camarón blanco se sabe muy poco. Soñanez-Organis y cols. (2012) detectaron actividad enzimática de la LDH mediante zimograma utilizando lactato como sustrato con un pH final de 8, al observar tres bandas diferentes en extracto de hepatopáncreas, mientras que solo se detectó una banda en branquias en el extracto de branquias y músculo después de la exposición de *L. vannamei* a hipoxia por 1 h.

### Sobreexpresión de las Subunidades Proteicas LDH-1 y LDH-2

En su proyecto de tesis de maestría, en el Laboratorio de la Dra. Yepiz Plascencia, Ochoa-Valdez (2012) obtuvo un plásmido recombinante para la subunidad de la LDH-2 de *L. vannamei*. La clonación, sobreexpresión y purificación de las subunidades de la LDH se llevó a cabo usando el sistema IMPACT (New England BioLabs). El vector de sobreexpresión utilizado fue el pTXB1, el cual contiene el promotor T7, el operón Lac para el control de la expresión de la proteína de interés, el gen que confiere la resistencia a la ampicilina, un gen de inteína que ha sido

modificado para auto-escindirse en presencia de ditioneitol (DTT) y un dominio de unión a quitina. La LDH-2 se fusiona en su extremo C-terminal a la etiqueta de inteína (28 kDa) auto escindible que contiene el dominio de unión a quitina (6 kDa), que le permite ser purificada por afinidad en una columna de quitina. La subunidad de la LDH-2 recombinantes pura tienen un tamaño de aproximadamente 36 kDa (analizadas por SDS-PAGE) y, con base a la migración en geles nativos de poliacrilamida (PAGE y zimograma), se estima que su forma activa es un tetrámero de  $\approx 140$  kDa.

En la actualidad, se desconoce cómo estas dos subunidades se asocian para formar proteínas activas y dar lugar a diferentes isoenzimas. Es importante investigar si la LDH además de presentarse en forma de tetrámero activo, puede encontrarse en forma dimérica como en otros crustáceos como la langosta *Homarus americanus* (REF). Finalmente, se desconocen las propiedades bioquímicas (estabilidad al pH y a la temperatura, pH y temperatura óptimos, especificidad a sustrato y actividad enzimática) y las características cinéticas de LDH-1 y LDH-2 del camarón blanco y si éstas son diferentes entre sí. La presencia de isoenzimas en *L. vannamei* ratificaría que la LDH es una enzima evolutivamente muy conservada en una gran variedad de organismos (Soñanez-Organis et al., 2012). Por lo tanto, caracterizar bioquímica y cinéticamente la isoenzima que forme LDH-2 recombinante contribuirá al conocimiento de la función de la LDH en respuesta a la hipoxia y, en un contexto más integral, contribuir a entender la complejidad y regulación del metabolismo energético que le permite al camarón sobrevivir ante este estrés.

## HIPÓTESIS

La asociación de las subunidades LDH-2 de la lactato deshidrogenasa del camarón blanco *L. vannamei* genera una enzima activa con características bioquímicas y cinéticas similares a las LDH de otros animales.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Caracterizar bioquímica y cinéticamente la enzima LDH-2 recombinante de camarón blanco *L. vannamei*.

### Objetivos Específicos

1. Sobreexpresar la subunidad LDH-2 recombinante en *E.coli* ER2566 y purificar por afinidad a una matriz de quitina.
2. Determinar los parámetros bioquímicos: pH óptimo, estabilidad al pH, la temperatura óptima y la estabilidad a la temperatura de la LDH-2 recombinante activa.
3. Evaluar la actividad enzimática de la LDH-2 recombinante, así como determinar la afinidad a sustrato.
4. Evaluar y determinar las constantes cinéticas ( $K_m$  y  $V_{max}$ ) de la proteína recombinante LDH-2 y la constante catalítica  $K_{cat}$ .

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sobreexpresión y Purificación de la Subunidad LDH-2 Recombinante

La sobreexpresión y purificación de la subunidad LDH-2 se llevó a cabo mediante el Sistema IMPACT (New England Biolabs) con ciertas modificaciones, partiendo del clon plasmídico recombinante que codifica para LDH-2 obtenido por Ochoa-Valdez (2012). La subunidad proteica de interés se fusiona en su extremo C-terminal a la etiqueta de inteína (28 kDa) auto escindible que contiene el dominio de unión a quitina (6 kDa), lo que permitió purificar la LDH por afinidad en una columna de quitina.

### Transformación de Células Competentes *E. coli* ER2566

Para la sobreexpresión se utilizó la cepa de *E. coli* ER2566 (New England Biolabs) transformada con el plásmido recombinante del clon 19 (LDH-2) obtenido por Ochoa-Valdez (2012). En la transformación se utilizaron 10 ng del plásmido recombinante con 50  $\mu$ L de células químicamente competentes, se incubó en hielo por 30 minutos, y se calentó a 42 °C por 90 segundos. Las células fueron colocadas en hielo y se agregó 250  $\mu$ L de medio SOC (extracto de levadura 0.5%, triptona 2%, cloruro de sodio 10 mM, cloruro de potasio 2.5mM, cloruro de magnesio 10 mM, sulfato de magnesio 10 mM, glucosa 20 mM), se incubó a 37 °C por 1 hora a 200 rpm. Finalmente se sembraron en placas con agar Luria Broth (LB) más 125  $\mu$ g/mL de ampicilina e incubaron a 37°C de 16 a 20 h.

## **Cultivos bacterianos e inducción de la sobreexpresión**

Se tomó una colonia resultante de la transformación, para hacer un preinóculo con 5 mL de LB y ampicilina (125 µg/mL), el cual se incubó toda la noche a 37 °C con agitación a 200 rpm. Del preinóculo anterior se tomaron 625 µL para un segundo cultivo con 25 mL de LB y se incubó a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar la densidad óptica (DO) de 0.6 a una longitud de onda de 600 nm. Por último, los 25 mL se añadieron a 1000 mL de caldo LB con ampicilina (125 µg/mL) y se incubó hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0.6, y se indujo la sobreexpresión con IPTG 0.2 mM, incubando por 2.5 h a 37 °C. Se centrifugó el cultivo anterior (5000 x g a 4°C por 15 min) colectando las bacterias como pellets celulares (Sorvall™ Centrifuge RC 5C Plus, Kendro) y se almacenaron a -80°C hasta la etapa de purificación.

Para el análisis de la inducción de la sobreexpresión se tomaron muestras de las fases no inducidas (sin IPTG) e inducidas (con IPTG), se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 13% con agente reductor (Laemmli, 1970), 15 mA de corriente (PowerPac3000™, Biorad) y a temperatura ambiente. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie G-250 coloidal (agua HPLC, sulfato de amonio al 10%, coomasie G-250 al 0.1%, ácido orto-fosfórico al 3% y etanol al 20%) (Neuhoff et al., 1988; Kang et al., 2002).

### **Purificación por Cromatografía de Afinidad**

El método de purificación se basa en la afinidad de la proteína de fusión a una matriz de quitina, el tratamiento con DTT para la activación de la inteína para el corte y liberación de la LDH. Los pellets bacterianos de la sobreexpresión se resuspendieron en un volumen del 10% del cultivo de sobreexpresión, en buffer columna (Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM, pH 8.5), con fluoruro de metilfenilsulfonilo (PMSF) 20 µM como inhibidor de proteasas y Tritón X-100 al 0.25%. Las bacterias resuspendidas se lisaron mediante sonicación con 4 pulsos de 10 segundos cada uno y pausas de 10 segundos manteniendo siempre el homogenizado en hielo. La

mezcla sonicada se centrifugó a 15,000 xg por 30 min a 8 °C (Avanti™ 30, Beckman Coulter) y se colectó la fase soluble o clarificado.

Para la purificación se utilizó una columna empacada con 7 mL de una matriz de quitina inmovilizada (New England Biolabs). La columna se conectó a una bomba peristáltica de flujo variable (Peristaltic Pump P-1, Pharmacia) y se lavó a flujo constante con 10 volúmenes de buffer de columna (70 mL) a una velocidad de flujo de 1 mL/min para equilibrar el sistema. Posteriormente se cargó el clarificado a la columna con un flujo de 0.5 mL/min, pasando el volumen total del mismo a través de la matriz en un sistema de recirculación cerrado. La columna se lavó con 20 volúmenes (140 mL) de buffer de columna con un flujo de 2 mL/min.

Para liberar la LDH de la proteína de fusión unida a la quitina, se añadieron 21 mL de buffer de corte (Tris-HCL 20 mM, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM, DTT 50 mM, pH 8.5), a una velocidad de 1 mL/min y se incubó de 12 a 16 h a 21°C. Finalmente, se procedió a eluir la LDH con el buffer de columna, colectando fracciones de 2 mL (Sistema IMPACT, New England Biolabs).

Se tomaron muestras en cada paso de la purificación y se analizaron en un gel SDS-PAGE al 13%. A las muestras a analizar, se les añadieron 15 µL de buffer muestra 2X (Tris-HCl 126 mM, glicerol 20%, SDS 4%, azul de bromofenol 0.02%, pH 6.8, mercaptoetanol 200 mM) y se calentaron a 95 °C por 5 minutos. Los geles se corrieron a 15 mA, a temperatura ambiente y se tiñeron con nitrato de plata (Schuchard et al., 2002).

La tinción con nitrato de plata se realizó incubando el gel en la solución fijadora (etanol 30%, ácido acético 10%) por 30 min, después se pasó a la solución incubadora (etanol 30%, acetato de sodio 4.1%, tiosulfato de sodio 0.13%, glutaraldehído 0.52%) por 30 min y enseguida se lavó con agua deionizada por 5 min con agitación suave en tres ocasiones. Posteriormente, se incubó con solución teñidora (etanol 20%, nitrato de plata 0.1%, formaldehído 0.02%) por 20 min, para después colocarlo en solución reveladora (etanol 20%, carbonato de sodio 2.5%, formaldehído 0.01%) hasta detectar las bandas de proteínas. Finalmente, la reacción

se detuvo lavando el gel con una última solución de EDTA 1.46% (Schuchard et al., 2002).

### Cuantificación de Proteína

La LDH-2 recombinante pura se cuantificó por el método de Bradford (Bradford, 1976) adaptado a microplaca (96 Well EIA/RIA Easy Wash™, Corning) y las determinaciones se realizaron por triplicado. Se mezclaron 20 µL de la muestra con 200 µL del reactivo Bradford (0.01% Coomassie Brilliant Blue G-250, 4.7% etanol, 8.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 595 nm (Microplate Reader 680™, Biorad). Se utilizó una curva estándar de seroalbúmina bovina para calcular la concentración de proteína en las muestras.

### Ensayos de Actividad Enzimática

#### **Zimograma para la LDH-2 Recombinante**

La detección de la actividad enzimática inversa de la LDH (oxidación del lactato) se realizó en geles nativos de poliacrilamida al 8% (Manchenko, 1994). Se cargaron 15 µg de la LDH-2 y se corrió a 15 mA constantes a 4 °C. Después se incubó el gel a 37 °C por aproximadamente 1.5 h en solución de reacción (60 mL de Tris-HCl 200 mM, pH 8; 12 mL L-Lactato 0.5 M, pH 8; 2.7 mL NAD<sup>+</sup> 10 mg/mL; 6.7 mL de nitroazul de tetrazolio 1 mg/mL; 6.7 mL de metasulfato de fenazina 1 mg/mL). La detección de la actividad se observó por el desarrollo de color azul oscuro en bandas definidas. Por último, se lavó el gel con agua y se fijó con etanol al 50%. Se utilizó un marcador para proteínas nativas (HMW Native Marker kit, GE Healthcare Life Science) que contiene LDH de corazón de bovino para estimar el peso molecular de la LDH-2 recombinante activa y como control positivo para la detección de la actividad enzimática.



## **Espectrofotometría para la Isoenzima Recombinante**

Se determinó la actividad enzimática de la LDH-2 recombinante por medio de espectrofotometría, con base al método descrito por Worthington (1988) con las modificaciones que se señalan a continuación.

Reducción de Piruvato a Lactato (método estándar). Se midió la oxidación del NADH por la disminución de la absorbancia a 340 nm (Cary 50™ UV-Vis, Varian) a 25 °C (Peltier™ PCB 1500, Varian) durante 5 minutos. La mezcla de reacción contenía 300 µL de Tris-HCl 140 mM pH 7.6; 25 µL de piruvato de sodio 80 mM, 25 µL NADH 6.6 mM, 100 µL de agua desionizada. La reacción se inició al añadir 50 µL de la enzima (0.05 mg/mL) en un volumen final de 0.5 mL. Cada determinación se realizó por triplicado y la actividad específica se expresa como µmoles de NAD<sup>+</sup> producidos/min/mg proteína.

Oxidación de lactato a piruvato (método estándar). Se midió la reducción del NAD<sup>+</sup> por el aumento de la absorbancia a 340 nm (Cary 50™ UV-Vis, Varian) a 25 °C (Peltier™ PCB 1500, Varian) durante 5 minutos. La mezcla de reacción contenía 300 µL de Tris-HCl 140 mM, pH 7.6; 25 µL de ácido láctico 80 mM, 25 µL de NAD 6.6 mM; 100 µL de agua desionizada y la reacción se inició al añadir 50 µL de la enzima (0.05 mg/mL), en un volumen final de 0.5 mL. Cada determinación se realizó por triplicado. La actividad específica se expresa como µmoles de NADH producidos/min/mg proteína (Worthington, 1988).

### **Estabilidad al pH y pH Óptimo**

La estabilidad de la LDH-2 recombinante se determinó a diferentes pH, manteniéndola por 1 hora a una temperatura de 25 °C en los siguientes amortiguadores: MES 0.1 M (pH 5.5-6.5), HEPES 0.1 M (pH 6.5-8.0), Tris HCl 0.1 M (pH 7.0-9.0), CHES 0.1 M (pH 8.5-10) y Bis-Tris Propano 0.1 M (pH 7.0-10.0). La actividad enzimática remanente se midió inmediatamente después de estos

tratamientos mediante el método estándar modificado descrito anteriormente (Worthington, 1988). El pH óptimo de la LDH-2 se determinó midiendo la actividad enzimática por el método estándar modificado descrito anteriormente (Worthington, 1988), utilizando las siguientes soluciones amortiguadoras: MES 0.1 M (pH 5.5, 6.0 y 6.5), HEPES 0.1 M (pH 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0), Tris HCl 0.1 M (pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 y 9.0), CHES 0.1 M (pH 8.5, 9.0, 9.5 y 10) y Bis-Tris Propano 0.1 M (pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5 y 10.0). Se utilizó el programa OriginPro 8 para graficar los datos obtenidos de ambas determinaciones. Los datos de pH óptimo se analizaron en el programa GraFit7 para determinar los valores de pKa, los valores se adecuaron a la ecuación de la doble campana (Segel, 1993).

$$Y = \frac{\text{Limit} * \text{temp} 1}{\text{alog} (2 * \text{pH} - \text{pKa}1 - \text{pKa}2) + \text{temp}1 + 1}$$

temp1 = alog(pH-pKa1).

Limit= Límites establecidos.

y= Actividades a pH óptimo.

### Estabilidad a Temperatura y Temperatura Óptima

La estabilidad de la LDH-2 recombinante de *L. vannamei* se determinó incubándola por 1 h a diferentes temperaturas (20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60°C) en buffer Tris-HCl 0.1 M a pH 7.5, inmediatamente después se determinó su actividad enzimática remanente mediante el método estándar modificado (Worthington, 1988). La temperatura óptima de la LDH-2 recombinante se determinó midiendo la actividad enzimática mediante el método estándar a diferentes temperaturas (20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60°C) en buffer Tris-HCl a un pH óptimo. El valor de la energía de activación se obtuvo analizando los datos de temperatura óptima y utilizando la ecuación de Arrhenius (Segel, 1976).

$$\text{Log } K = \text{log } A + \frac{Ea}{2.3 RT}$$

Donde:

Log K = Constante cinética (depende de la temperatura).

Ea=Energía de activación

T= Temperatura en grados kelvin

R = Constante universal de los gases.

Log A= Factor exponencial

Se utilizó el programa OriginPro 8 para graficar los datos obtenidos de ambas determinaciones.

#### Afinidad a Sustrato

La afinidad a sustrato de la LDH-2 recombinante se determinó midiendo la actividad enzimática utilizando diferentes sustratos. Los sustratos que se utilizaron fueron: piruvato (15 y 80 mM), lactato (15 y 80 mM), oxalato de sodio (15 y 80 mM) y fenilpiruvato (15 y 80 mM) y las coenzimas NAD<sup>+</sup> (6.6 mM), NADH (6.6 mM) y NADP<sup>+</sup> (6.6 mM). La actividad enzimática se midió mediante el método estándar modificado (Worthington, 1988).

#### Patrones de velocidad inicial

Las constantes cinéticas de la LDH-2 recombinante se obtuvieron midiendo la velocidad inicial de la reacción variando las concentraciones de piruvato (2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15 mM) y de NADH (2, 3, 4, 6 y 8 mM). La actividad se midió variando la concentración de piruvato y manteniendo la de NADH fija-variable, y en otro experimental manteniendo las concentraciones de NADH variable y las de piruvato fijas variables. Los valores de velocidad inicial se graficaron utilizando la ecuación de Michaelis Menten:

$$v = \frac{V_{max}}{K_m + [S]}$$

Donde:

$v$  = velocidad inicial

$V_{max}$  = Velocidad máxima

$[S]$  = Concentración de sustrato

$K_m$  = Constante de Michaelis - Menten

Después se re-graficaron los datos cinéticos, linearizándolos mediante la ecuación de Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Donde:

$v$  = velocidad inicial

$V_{max}$  = Velocidad máxima

$[S]$  = Concentración de sustrato

$K_m$  = Constante de Michaelis - Menten

Posteriormente, se determinaron los valores de los interceptos ( $1/V_{max}$ ) y la pendiente ( $K_m / V_{max}$ ) para cada concentración de sustrato utilizada en los ensayos de actividad. Se graficaron los valores del intercepto contra el inverso de la concentración del sustrato. Por último, de la gráfica del intercepto contra el inverso de la concentración de sustrato, para determinar los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  real (Segel, 1993). Los datos cinéticos se analizaron en el programa GraFit7. La actividad se expresó como actividad específica en  $\mu\text{moles de NAD}^+/\text{min}/\text{mg}$  de proteína.

Para la determinación de  $K_{cat}$  se utilizó el valor de la  $V_{max}$ , peso molecular de la subunidad (36022 Da) y la concentración molar de la enzima utilizando la siguiente ecuación (Segel, 1973):

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]_t} = \frac{\mu\text{moles (de } S \rightarrow P) \text{ min}^{-1} \times \text{mL}^{-1}}{\mu\text{moles (de } E) \text{ mL}^{-1}}$$

Donde:

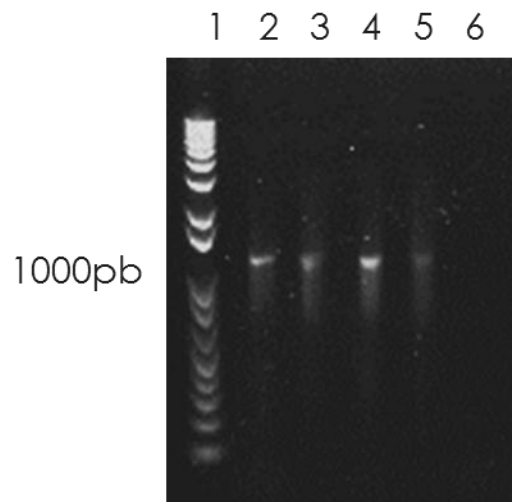
$V_{max}$  = Velocidad máxima

$[E]_t$  = Concentración molar de la enzima total

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

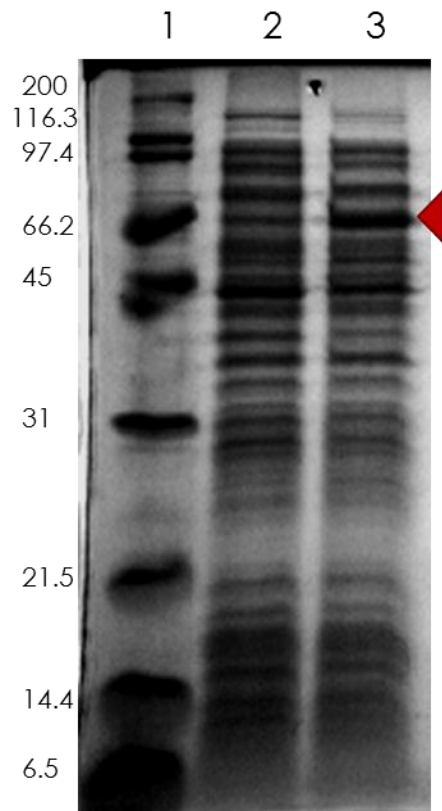
### Sobreexpresión de la subunidad de LDH-2 en *E.coli* ER2566

El clon plasmídico recombinante que codifica para la subunidad LDH-2 obtenido por Ochoa-Valdez (2012), se utilizó para transformar células de *E. coli* ER2566 químicamente competentes, para sobreexpresar y purificar la LDH-2 recombinante en cantidad suficiente para la caracterización bioquímica y cinética. Mediante la técnica de PCR punto final, se analizaron 3 colonias con el fin de comprobar que las células contenían el constructo plasmídico. El producto de PCR se muestra en la Figura 3 con un tamaño aproximado de 1000 pb, confirmando la presencia del plásmido recombinante en las colonias de *E. coli* ER2566 analizadas.



**Figura 3.** PCR de la transformación de las colonias de *E. coli* ER2566 con el plásmido recombinante de LDH-2. Gel de agarosa al 1%. Carriles 5-7: colonias de LDH-2 positivas; carril 8: Control positivo; carril 9: control negativo.

Después de confirmar la transformación de las bacterias, se seleccionó una colonia para llevar a cabo la sobreexpresión de la LDH-2 recombinante, bajo las condiciones mencionadas en la metodología. Las células bacterianas se recolectaron por centrifugación y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta realizar la prueba de solubilidad. En el análisis electroforético por SDS-PAGE de los extractos bacterianos se obtuvo una proteína de fusión de aproximadamente 70 kDa que corresponde a la subunidad LDH-2 (36 kDa), unida a un dominio de unión a quitina (6 kDa) y a un segmento de proteína denominada inteína (28 kDa) (Figura 4).



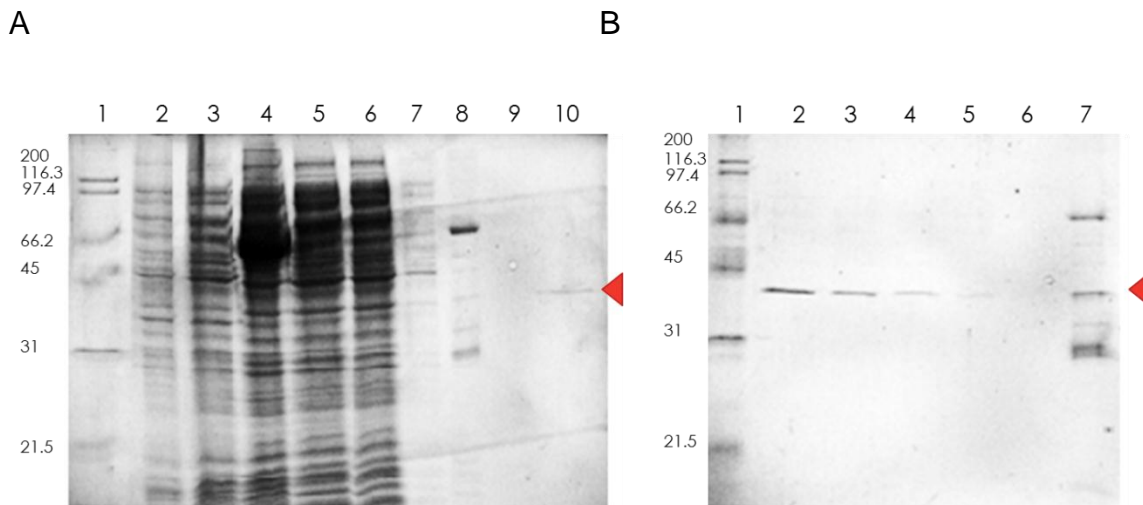
**Figura 4.** Sobreexpresión de la subunidad proteica de LDH-2. Electroforesis SDS-PAGE al 13% de la subunidad de LDH-2 sobreexpresada e inducida con IPTG. 1. Marcador de peso molecular (Broad Range), 2. Cultivo sin inducir, 3. Cultivo inducido.

Distintas cepas de *E. coli* han sido utilizadas para la producción de proteínas recombinantes que no requieren modificaciones post-traduccionales, como la glicosilación (Baneyx et al., 1999). La concentración de IPTG que se utilizó en este trabajo fue de 0.2 mM, la cual está dentro del rango reportado (entre 0.005 y 1 mM) (Donovan et al., 1996). Donovan y cols. (1996) reportaron que las condiciones óptimas para la inducción de la expresión de proteínas recombinantes bajo el control del promotor lac, dependen de la concentración del inductor y el punto en el que se añade. La LDH-2 se sobreexpresó adecuadamente por lo que se continuó con su purificación y caracterización bioquímica y cinética.

#### La subunidad de LDH-2 Recombinante Purificada por Afinidad a Quitina

El pellet bacteriano de la sobreexpresión de la subunidad de LDH-2 se resuspendió en el buffer columna, se lisó por sonicación y se centrifugó obteniendo la fracción soluble o clarificado y la fracción insoluble se almacenó a -80 °C, para una segunda purificación. En el clarificado se le midió la actividad enzimática mediante espectrofotometría, y la proteína de fusión LDH-2 presentó una actividad de 0.15 U/mL. Posteriormente, el clarificado se aplicó a una matriz de quitina, donde se retuvo la proteína de fusión LDH-2 y se lavó la columna para eliminar las proteínas contaminantes. Se incubó la columna por 19 horas a 21 °C en el buffer de corte con DTT. En la elución se colectaron fracciones de 2 mL, en las que se determinó la actividad enzimática y se analizaron en geles por SDS-PAGE al 13% teñidos con nitrato de plata y Coomassie coloidal G-250. En la figura 5 (panel A) se muestra el gel del análisis de la sobreexpresión y purificación de LDH-2 recombinante; se observa la proteína de fusión de 70 kDa en el carril 4, así como también la subunidad de LDH-2 pura (36 kDa) en el carril 10.





**Figura 5.** Geles de la subunidad de LDH-2 recombinante durante el proceso de purificación. A Carril 1: carcador Broad Range; carril 2: control sin inducir; carril 3: inducido; carril 4. sonicado; carril 5: clarificado; carril 6: proteína no adherida a la matriz; carril 7: lavado, carril 8: matriz de quitina antes del corte; carril 9: lavado con buffer DTT; carril 10: LDH-2 eluída, fracción 1. B. Carril 1: marcador Broad Range; carriles del 2 al 6: fracciones eluidas de la matriz de quitina; carril 7: matriz de quitina después del corte con DTT.

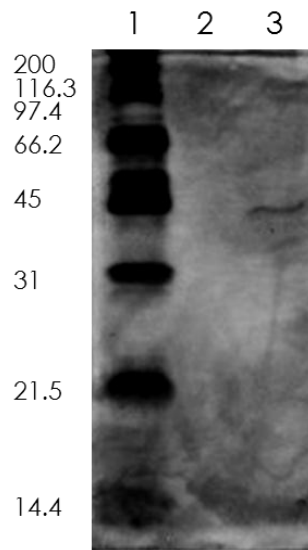
En la figura 5 (panel B) se muestra la subunidad de LDH-2 pura en los carriles 2, 3, 4 y 5. En la fracción del carril 6 ya no se detecta la subunidad de LDH-2. Sin embargo, en el carril 7 podemos observar que en la matriz todavía queda retenida la subunidad de LDH-2 que no se logró eluir.

En la Tabla 1 se muestra los pasos para la purificación de la subunidad de LDH-2 de *L. vannamei*. La LDH-2 fue purificada con una recuperación del 14% y la purificación final de la enzima fue de 3.4 veces con una actividad específica de 0.72  $\mu\text{moles NAD}^+/\text{min}/\text{mg}$  de proteína. El cuadro de purificación muestra que la cromatografía por afinidad es un método efectivo para la purificación de LDH-2 recombinante y que aproximadamente el 40% de la proteína total es LDH-2 confirmando que la enzima se estaba sobreexpresando.

**Tabla 1.** Cuadro de purificación de la LDH-2.

Pasos	Proteína (mg)	Actividad Especifica ( $\mu$ moles $\text{NAD}^+$ /min/mg de proteína)	Actividad total ( $\mu$ mol/min)	Recuperación (%)	Veces de Purificación
Sonicado	76.6	0.21	16.1	100	1
Clarificado (Centrifugado)	30.37	0.46	14.01	87	2.2
Afinidad	2.69	0.72	1.93	14	3.4

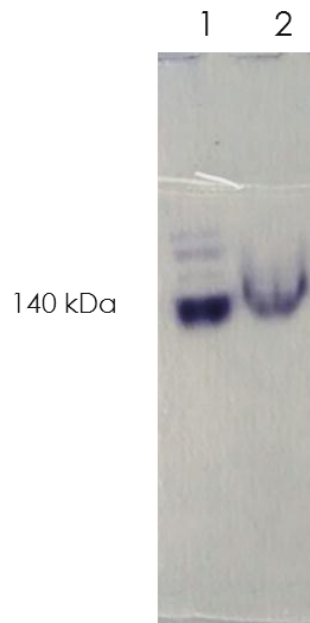
Las fracciones de la LDH-2 recombinante pura se mezclaron y concentraron al 50% del volumen original utilizando centricones de 30 kDa y se almacenaron en glicerol al 20% a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su caracterización bioquímica. La proteína se cuantificó por el método de Bradford obteniendo una concentración de 0.049 mg/mL y se determinó su actividad enzimática. La actividad específica total de la LDH-2 recombinante purificada y concentrada fue de 3.062 U/mg de proteína. Se analizó la mezcla de las fracciones por SDS-PAGE al 13% y se tiñó con nitrato de plata para verificar su pureza (Figura 6).



**Figura 6.** LDH-2 recombinante pura. Gel SDS-PAGE al 13% teñido con plata. Carril 1: marcador Broad Range; carril 3: LDH-2 pura (36 kDa).

## Zimograma de la LDH-2

Se analizó la actividad de la LDH-2 cualitativamente en un gel nativo incubado con lactato y  $\text{NAD}^+$  para la producción de piruvato y NADH. En el gel (Figura 7) se corrió un marcador para proteínas nativas (HMW Native Marker kit, GE Healthcare Life Science) que contiene LDH de corazón de bovino con un tamaño aproximado de 140 kDa. El tamaño de la banda que se observa para la LDH-2 es similar al de la LDH de corazón de bovino, lo que indica que la forma activa de la LDH-2 de *L. vannamei* es un tetrámero, y que concuerda con lo reportado para diversos organismos vertebrados e invertebrados. Thebault, (1983) determinó mediante cromatografía en sephadex G200, que el peso molecular de la LDH de *Palaemon serratus* es de 140 KDa. También se realizó una electroforesis en condiciones nativas (zimograma) y desnaturalizantes, concluyendo que la forma activa de la LDH de *Palaemon serratus* es un tetrámero.

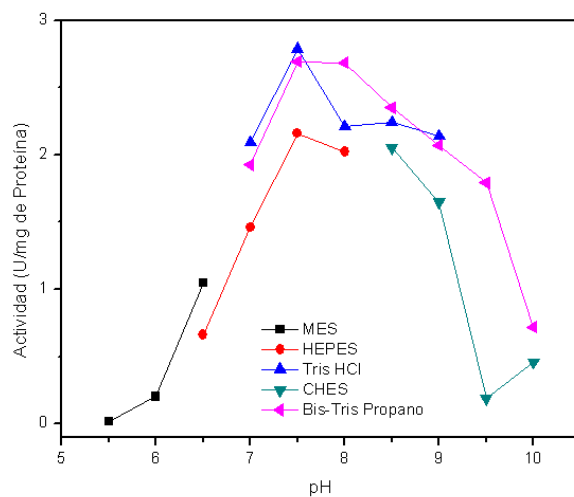


**Figura 7.** Zimograma de la LDH-2 recombinante purificada. Carril 1: marcador HMW Native Marker kit (banda que corresponde a la LDH de corazón de bovino); carril 2: LDH-2 activa.

### Efecto del pH en la actividad de la LDH-2

pH óptimo de la LDH-2. La oxidación de  $\text{NADH}^+$  por la LDH-2 utilizando diferentes amortiguadores se muestra en la figura 8. La LDH-2 recombinante de *L. vannamei* tiene un pH óptimo de 7.5, tanto en Bis-Tris Propano, como con Tris-HCl. La alta actividad de LDH-2 en Bis-Tris Propano y Tris-HCl indica que el pH óptimo de esta enzima es independiente del buffer que se utilice.

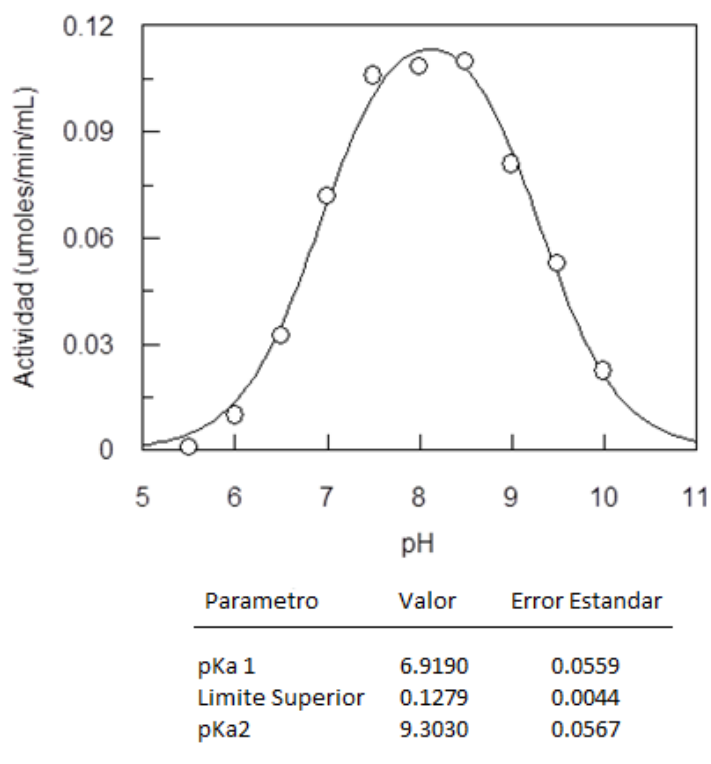
El pH óptimo de la LDH-2 coincide con el reportado para la LDH-A del krill antártico que presentó un pH óptimo de 7.5 para la reducción de piruvato. El valor de pH para todas las isoenzimas de LDH de humano oscila entre 7.2 y 7.4 (Gay et al., 1968). Resultados semejantes a las LDHs de humano obtuvieron Mulkiewicz y cols. (2001), quienes reportaron un valor de 7.4 para la LDH-A y un pH de 7.2 para la LDH-B<sub>4</sub> para los perfiles de pH en la reducción de piruvato del krill del norte. Ya que el pH se maneja en escala logarítmica, diferencias de 0.1 en el pH son grandes. Los resultados de pH óptimo de la LDH-2 recombinante de *L. vannamei* indican que su actividad puede modularse por los cambios en el pH.



**Figura 8.** Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la LDH-2 recombinante de *L. vannamei*.

Con base en los resultados de pH óptimo se obtuvieron los valores de pKa para la LDH-2. Los valores de pKa se determinaron utilizando una curva que se construyó tomando un valor de actividad para cada pH sin importar el amortiguador utilizado para la reacción (figura 9). Los valores se analizaron en el programa GraFit7 utilizando la ecuación de la doble campana.

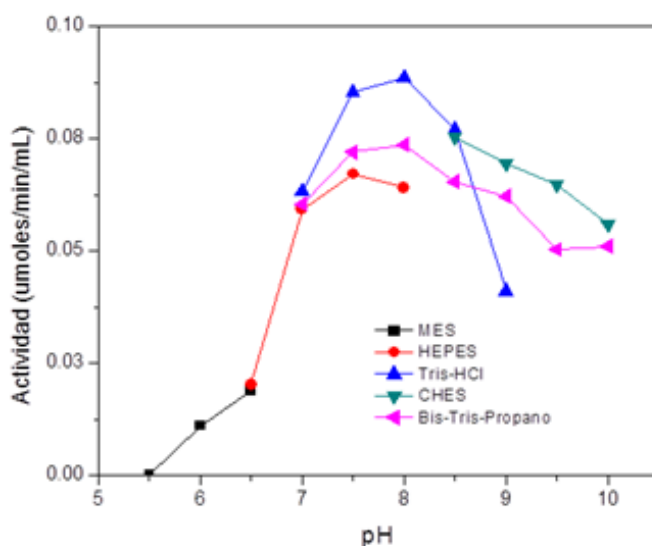
Los valores de pKa para LDH-2 de 9.3 y 6.9, los cuales corresponden a la histidina y su grupo imidazol, respectivamente (Figura 9). En la secuencia primaria de LDH-2 este aminoácido corresponde a la His<sup>193</sup>. Rabiou y cols. (2013) reportaron valores de pKa de 6.7 y 7.4, que corresponden al grupo imidazol de la histidina y al grupo hidroxil de la tirosina, respectivamente, de la LDH de músculo de pollo. Estos valores de pKa nos sugieren que la histidina es uno de los aminoácidos responsables de la catálisis y/o de la unión del sustrato a la enzima.



**Figura 9.** Cambios en la actividad de LDH-2 recombinante de *L. vanamei* en función al pH

Estabilidad de la LDH-2 al pH. Se determinó la estabilidad de la LDH-2 incubándola por 1 hora a diferentes pH. En la figura 10 se muestra que la LDH-2 recombinante de *L. vannamei* es estable entre los pH de 7 a 8.5, a partir de pH 8.5 la actividad comienza a disminuir paulatinamente, perdiendo el 50% de su actividad a pH de 9.5. Lo anterior demuestra que la LDH-2 es estable dentro de un amplio rango de pH. La estabilidad de la LDH-2 está relacionada con la estructura conformacional de las proteínas y cualquier compuesto que influya en las interacciones entre las cadenas de aminoácidos tendrá un efecto sobre la estabilidad. Los cambios en el pH afectan a la carga eléctrica de los grupos ácidos y básicos de las cadenas laterales de los aminoácidos. Esta alteración de la carga superficial de las proteínas elimina las interacciones electrostáticas que estabilizan la estructura terciaria y a menudo provoca su precipitación (Koolman & Rohm, 2005).

La LDH-2 presenta la mayor estabilidad y el pH óptimo en los amortiguadores en los Bis-Tris Propano y Tris-HCl. Lo anterior, puede deberse a que el compuesto Tris favorece la actividad de la LDH-2. La estabilidad de la LDH-2 en los amortiguadores Bis-Tris Propano y Tris-HCl respalda los resultados de pH óptimo, donde la actividad de la LDH-2 es mejor en ambos amortiguadores y que la mayor actividad de la LDH-2 se encuentra entre pH de 7 y 8.5.



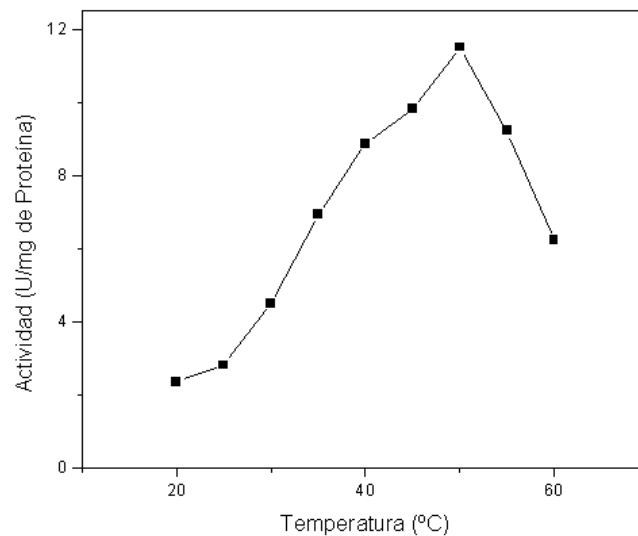
**Figura 10.** Estabilidad de la LDH-2 recombinante de *L. vannamei* al pH.

### Efecto de la temperatura sobre la actividad de la LDH-2

Temperatura óptima de la LDH-2. El aumento de temperatura acelera las reacciones químicas y la temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima, se conoce como temperatura óptima (Mulkiwicz et al., 2001). La actividad de la LDH-2 recombinante aumentó conforme al incremento de la temperatura, obteniendo su máxima actividad catalítica a los 50°C, sin embargo, a los 60°C la LDH-2 perdió la mitad de su actividad máxima (Figura 11). La LDH-2 es más resistente a altas temperaturas en comparación con la LDH-B del krill del norte que a 45°C comenzó a perder su actividad y a 55°C fue completamente inactiva (Mulkiwicz et al., 2001). Por otro lado, la LDH-A del krill del norte fue más activa y estable a 50°C presentando un comportamiento similar a la LDH-2 recombinante de *L. vannamei*. Resultados semejantes presentó la LDH-A del krill antártico, la LDH-A es activa y estable a 50°C y rápidamente pierde su actividad a 62°C (Mulkiwicz et al., 2001). La temperatura óptima tan alta de la LDH-2 puede deberse a un mecanismo de

adaptación de *L.vannamei*, por ejemplo la actividad máxima de la LDH en los *Trematomus* se observa a temperaturas muy por debajo de las enzimas homologas, de organismos que viven en ambientes más cálidos señalando una adaptación fisiológica al ambiente frío a lo largo del tiempo (Jobling, 1995; Hochachka, 1973).

La temperatura juega un papel muy importante en la célula, ya que es una manera de regular las reacciones, la LDH-2 recombinante de *L. vannamei* tiene una temperatura óptima alta, sin embargo, la temperatura interna del camarón oscila entre 25 y 30 °C (Dall et al., 1990).



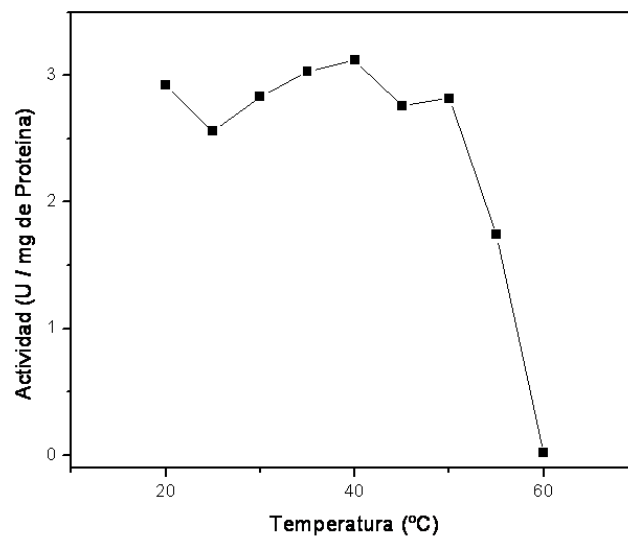
**Figura 11.** Efecto de la temperatura en la actividad enzimática de la LDH-2 recombinante de *L.vannamei*.

Con base en los resultados de la temperatura óptima se determinó la energía de activación de la LDH-2, la cual es el aporte inicial de energía necesaria para iniciar una reacción química (Montoya, 2008). Para calcular la energía de activación, se utilizó ecuación de Arrhenius linealizada. La energía de activación de la LDH-2 de camarón presenta un valor de 44.8 kJ/mol\*K, similar



a la de la LDH-5 de suero humano el cual es de 40.9 kJ/mol\*K (Tanishima et al., 1995).

Estabilidad de la LDH-2 a la temperatura. Se determinó la estabilidad de la LDH-2 incubándola por 1 hora a diferentes temperaturas. En la figura 12 se muestra que LDH-2 es estable a temperaturas entre 20 °C y 50 °C ya que mantuvo el 80% de su actividad. A 55 °C la LDH-2 pierde rápidamente su actividad, siendo completamente inactiva a 60 °C. Resultados similares obtuvieron Mulkiwicz y cols. (2001) para la LDH del krill antártico, reportando que es activa y estable a 50°C y rápidamente perdía su actividad a 62°C



**Figura 12.** Estabilidad de la LDH-2 recombinante de *L: vannamei*, incubada por 1 h a diferentes temperaturas.

Tanto para la estabilidad como para la temperatura óptima la LDH-2 presenta actividad desde 20 a 50 °C y después la pierde rápidamente.

## Afinidad A Sustrato de la LDH-2

Una de las principales características de las enzimas es su alta especificidad al sustrato, por lo que para la LDH-2 este parámetro fue determinado probando diferentes sustratos y coenzimas. En la tabla 2 se muestra la actividad específica que presentó la LDH-2 con cada sustrato. Originalmente, se detectó que el transcrito de la subunidad LDH-2 de *L. vannamei* predominó en el tejido muscular (Soñanez-Organis et al., 2012) y, en este estudio, la LDH-2 recombinante presentó la mayor actividad en presencia de piruvato 15 mM y NADH 6.6 mM, con un valor de 5.33  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína, mostrando una mayor afinidad a piruvato, lo cual podría relacionarse con la función de la LDH-2 en músculo. Los resultados en la tabla 2 muestran también que la LDH-2 recombinante es inhibida a altas concentraciones de piruvato (80 mM), disminuyendo la actividad hasta 2.82  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína.

La LDH-2 recombinante presentó una actividad de 0.495  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína en presencia de lactato y  $\text{NAD}^+$ , lo cual es una baja actividad en comparación a cuando el sustrato es piruvato y NADH. Sin embargo, la actividad de la LDH-2 presentada en el zimograma, en donde se usó lactato (500 mM) como sustrato, sugiere que la actividad de la LDH-2 es reversible. A diferencia de la LDH-2 y de varias LDHs de otros organismos, Thebault, (1981) reportó que la LDH de músculo de *Palaemon serratus* no presentaba actividad utilizando lactato como sustrato.

**Tabla 2.** Actividad específica de la LDH-2 recombinante de *L. vannamei*.

Sustrato	[mM]	NADH [6.6 mM]	NAD <sup>+</sup> [6.6 mM]	NADP <sup>+</sup> [6.6 mM]
Piruvato	15	<b>5.330</b>	0.100	0.070
	80	2.820	NA	0.178
Lactato	15	0.148	0.150	0.148
	80	NA	0.495	0.258
Fenilpiruvato	15	NA	NA	0.138
	80	0.138	NA	0.050
Oxalato de Sodio	15	0.210	0.075	0.125
	80	NA	0.443	0.113

\*NA: No se detectó actividad.

\*Valores de actividad específica (μmoles/min/mg de proteína).

#### Determinación de las constantes cinéticas $K_m$ y $V_{max}$

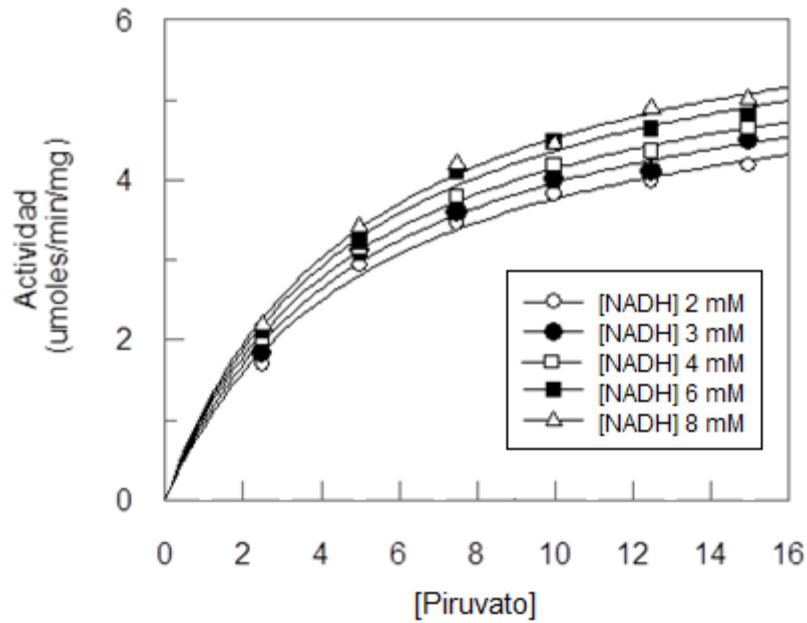
El análisis de los datos de velocidad inicial muestra un comportamiento hiperbólico típico de una cinética michaeliana (Figuras 13 y 15). Después esos mismos datos se linearizaron mediante la ecuación de Lineweaver-Burk y se encontró un patrón de líneas que se intersectan (Figuras 14 y 16), lo que sugiere que la reacción catalizada por la LDH-2 es una reacción bisustrato del tipo bi-bi secuencial ordenado. Posteriormente, se graficaron los interceptos contra el inverso de la concentración de sustrato para obtener los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  (Figuras 17 y 18).

La LDH-2 recombinante de *L. vannamei* presentó una  $K_{m\text{ NADH}}$  de  $0.57 \pm 0.009$  mM y una  $K_{m\text{ piruvato}}$  de  $5.406 \pm 0.3135$  mM, así como una  $V_{max}$  de 7.45 μmoles/min/mg de proteína. Si la enzima sigue un mecanismo secuencial ordenado, los resultados obtenidos sugieren que el orden de unión de los sustratos a la enzima sea en primer lugar el NADH, seguido por el piruvato y tras el paso catalítico se liberen secuencialmente lactato y NAD<sup>+</sup>, mecanismo cinético que sigue la LDH de la langosta *Homarus americanus* (Johns & Somero, 2004). El valor de  $K_m$  para piruvato de la LDH-2 recombinante de *L. vannamei* se encuentra por arriba de los valores reportados para los crustáceos

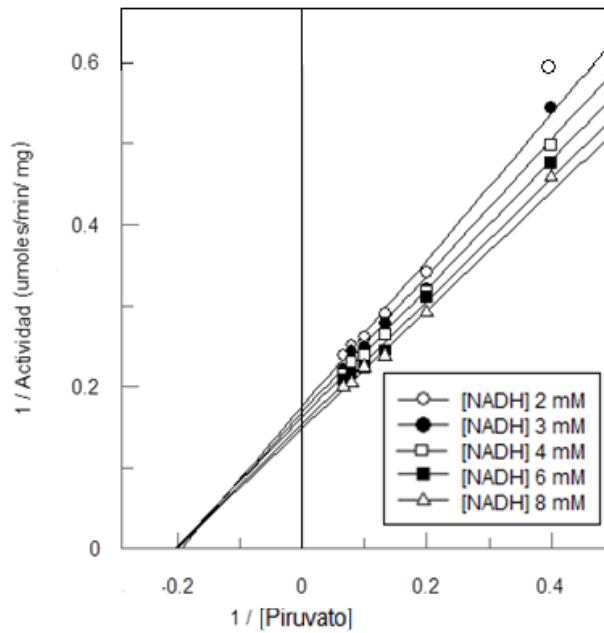
*Homarus americanus* ( $K_m = 0.24$  mM), *Saduria entomon* ( $K_m = 0.15$  mM) y *Euphausia superba* ( $K_m = 0.18$  mM) (Johns & Somero, 2004; Mulkiewicz et al., 2000; Mulkiewicz et al., 2001). El valor de  $K_m$  para NADH se encuentra muy por encima del valor reportado para el crustáceo *Homarus americanus* ( $K_m = 0.061$  mM), aproximadamente 10 veces más grande.

El valor de  $K_m$  para piruvato nos indica que la enzima LDH-2 recombinante requiere de concentraciones altas de piruvato para alcanzar su velocidad máxima en comparación con las de otros crustáceos. Esto sugiere que la LDH-2 alcanza su velocidad máxima cuando existe una alta acumulación de piruvato, resultado de una disminución en la velocidad del ciclo del Krebs, provocada por una disminución en el transporte de electrones (respiración mitocondrial) consecuencia directa de la baja concentración de oxígeno en el ambiente. Estos resultados contribuyen a explicar la capacidad de *L. vannamei* para sobrevivir bajo condiciones de baja concentración de oxígeno.

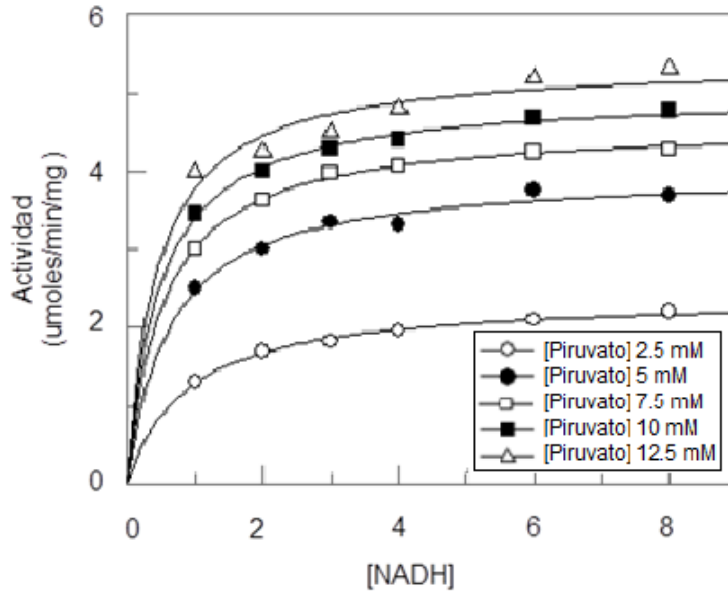
El valor de  $V_{max}$  ( $7.4$   $\mu$ moles/min/mg de proteína) de la LDH-2 de *L. vannamei* es diferente de los reportados para la enzima de otros crustáceos, valor que demuestra la clara influencia de las condiciones en las que dicho parámetro se calcula. Por ejemplo, *Saduria entomon* presenta una  $V_{max} = 601.4$   $\mu$ moles NADH/min/mg a pH 6.5 y 30 °C (Mulkiewicz et al., 2000), en LDH-A y LDH-B de *M. norvegica* se obtuvieron  $V_{max}$  de 354.2  $\mu$ moles NADH/min/mg y 436.8  $\mu$ moles NADH/min/mg a 30 °C a pH 7.4 y 7.2 respectivamente (Mulkiewicz et al., 2001).



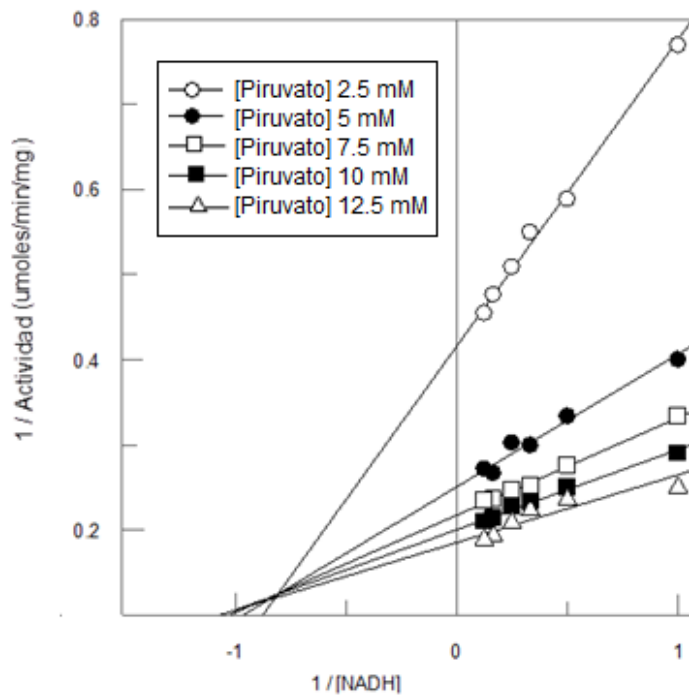
**Figura 13.** Patrones de velocidad inicial de la LDH2 recombinante. Sustrato variable: piruvato.(2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 mM), sustrato fijo-variable: NADH (2, 4, 6, 8 y 10 mM)



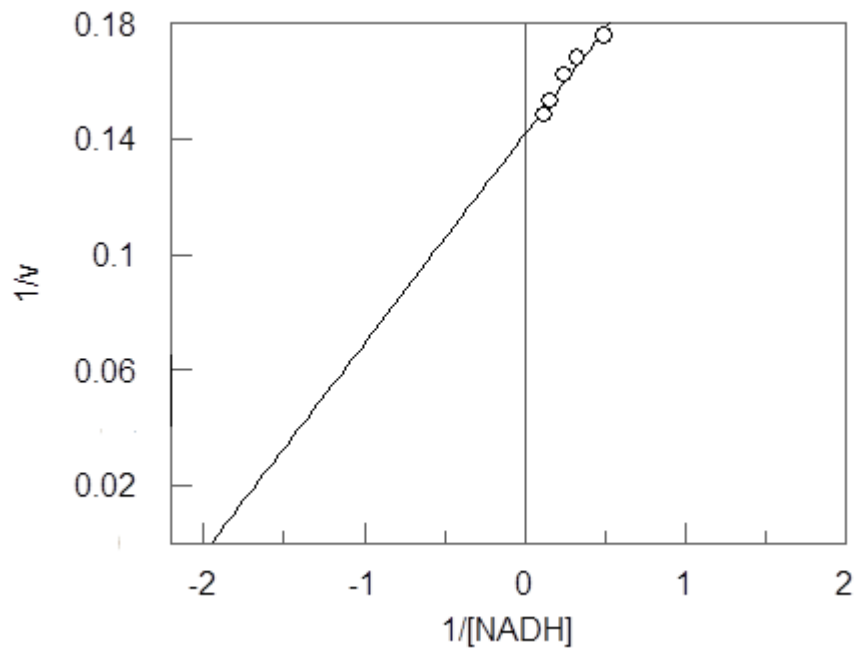
**Figura 14.** Gráfica de Lineweaver-Burk de los datos de velocidad inicial de la LDH-2 recombinante. Sustrato variable: Piruvato, sustrato fijo-variable NADH.



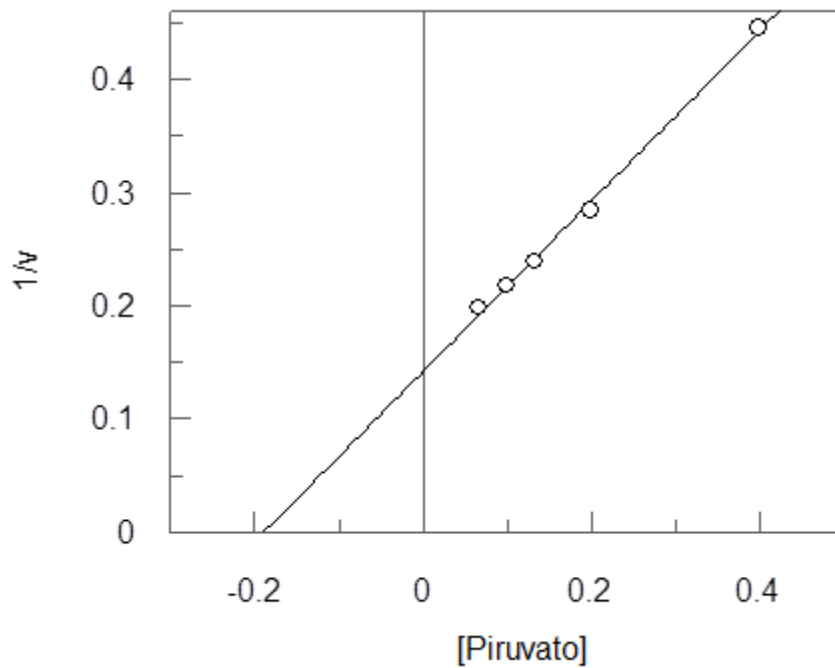
**Figura 15.** Patrones de velocidad inicial de la LDH-2 recombinante. Sustrato variable: NADH (2, 4, 6, 8 y 10 mM), sustrato fijo-variable: piruvato (2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 mM)



**Figura 16.** Gráfica de Lineweaver-Burk de los datos de velocidad inicial de la LDH-2 recombinante. Sustrato variable: NADH, sustrato fijo-variable: Piruvato.



**Figura 17.** Gráfica de Interceptos contra el inverso de la concentración de NADH.



**Figura 18.** Gráfica de Interceptos contra el inverso de la concentración de piruvato.

Con base en los valores de  $V_{\max}$  (7.4  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mL}$ ) y la concentración molar ( $5.55 \times 10^{-4}$   $\mu\text{moles}/\text{mL}$ ) de la LDH-2 recombinante, se determinó la constante catalítica ( $K_{\text{cat}}$ ). La  $K_{\text{cat}}$  calculada fue de  $13333.33 \text{ min}^{-1}$  y el tiempo de cada ciclo catalítico fue de 4.504  $\mu\text{seg}$ .



## CONCLUSIONES

La asociación de las subunidades de LDH-2 recombinante de *L. vannamei* generaron la enzima activa LDH-2, la cual se purificó y caracterizó. La LDH-2 es similar en cuanto a su estabilidad a pH y temperatura, así como a su pH y temperatura óptima a la LDH de crustáceos, ratificando que esta enzima es muy conservada entre especies. La LDH-2 sigue una cinética Michaeliana y sus parámetros cinéticos sugieren que está implicada en la respuesta a hipoxia de *L. vannamei*. La caracterización de la LDH-2 recombinante amplía el conocimiento que ayuda a explicar su funcionamiento y cómo el camarón *L. vannamei* se ha adaptado para sobrevivir a la hipoxia a través de la regulación de su metabolismo.

## REFERENCIAS

- Angers, A., Pothier, F., Sevigny, J.M., Sainte-Marie, B. (1994). Tissue specificity and ontogeny of lactate dehydrogenase in snow crab, *Chionoecetes opilio* Brachyura Majidae. **Comp Biochem Physiol B**. 108: 385-395.
- Baneyx, F., Ayling, A., Palumbo, T., Thomas, G., Georiou, G. (1991). Optimization of growth conditions for the production of proteolytically-sensitive proteins in the periplasmic space of *Escherichia coli*. **Appl Microbiol Biotechnol**.36: 14-20.
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Curr Opin Biotechnol**.10: 411-421.
- Bittar, Ph. G., Y. Charnay, L. Pellerin, C. Bouras, Magistretti, P. (1996). Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain. **J Cerebral Blood Flow Metab**. 16: 1079–1089.
- Boyd, C.R. (1989). Water quality management and aeration in shrimp farming. Fisheries and Allied Aquacultures Departmental Series No. 2, p. 183.
- Bradford M.M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. 72:248-254.
- Brouwer, M., Brown-Peterson N., Larkin P., Patel V., Denslow N., Manning S., Brouwer T. (2007). Molecular and whole animal responses of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, exposed to chronic hypoxia. **J Exp Mar Biol Ecol**. 341: 16-31.
- Brown-Peterson N., Manning C., Patel V., Denslow N., Brouwer M. (2008). Effects of cyclic hypoxia on gene expression and reproduction in a Grass Shrimp, *Palaemonetes pugio*. **Biol Bull**. 214:6-21.
- Burnett L.E., Stickle W.B. (2001). Physiological responses to hypoxia. Coastal hypoxia: consequences for living resources and ecosystems. **Coast Estuar Stud**. 58:3
- Chang-Dong, Z., Zhen-Hua, W. (2013) Strategies for hypoxia adaptation in fish species: a review. **Comp Biochem Physiol B**. 183:1005-13
- Chen, X., Gu, X., Shan, Y., Tang, W., Yuan, J., Zhong, Z., Wang, Y., Huang, W., Wan, B., Yu, L. (2009). Identification of a novel human lactate dehydrogenase gene LDHAL6A, which activates transcriptional activities of AP1 (PMA). **Mol Biol Rep**. 36: 669–676.

- Cheng W., Liu C.-H., Hsu J.-P., Chen J. (2003). Effect of hypoxia on the immune response of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its susceptibility to pathogen *Enterococcus*. **Fish Shellfish Immunol.** 13:351-365.
- Dall, W., Hill, J., Rothlisberg, P., Staples, D. (1990). The biology of Penaeidae. Advances in marine biology. **Academic Press.** 27: 489
- De Bari, L., Chieppa, G., Marra, E., Passarella, S. (2010). L-lactate metabolism can occur in normal and cancer prostate cells via the novel mitochondrial L-lactate dehydrogenase. **Int J Oncol.** 37: 1607–1620
- Diaz J.R., Rosenberg R. (1995). Marine benthic hypoxia: a review its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna. **Oceanogr Mar Biol.** 33:245-303.
- Drent, M., Cobben, A.M., Henderson, R.F., Wouters, E.F.M., Dieijen-Visser, M. (1996). Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes as indicators of lung damage or inflammation **Eur Respir J.** 9: 1736-1742.
- Dubouchaud, H., Butterfield, G.E., Wolfel, E.E., Bergman, B.C., Brooks, G.A. (2000). Endurance training, expression, and physiology of LDH, MCT1, and MCT4 in human skeletal muscle. **J. Physiol Endocrinol Metab.** 278: 571–579.
- Donovan, R., Robinson, C., Glick, B. (1996). Review: Optimizing inductor and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. **J Ind Microbiol.** 16: 145-154.
- Eichner, R., Kaplan, N. (1977). Physical and chemical properties of lactate dehydrogenase in *Homarus americanus*. **Arch Biochem Biophys.** 181:490-500.
- Eichner, R., Kaplan, N. (1977). Catalytic properties of lactate dehydrogenase in *Homarus americanus*. **Arch Biochem Biophys.** 181:501-507.
- Edwards, Y., West, L., Van Heyningen, V., Cowell, J., Goldberg, E. (1989). Regional localization of the sperm-specific lactate dehydrogenase, LDHC, gene on human chromosome 11. **Ann Hum Genet.** 53: 215–219.
- England, W.R., Baldwin, B. (1985). Anaerobic energy metabolism in the tail musculature of the Australian yabby *Cherax destructor* (crustacea, decapoda, parastacidae). Regulation of anaerobic glycolysis. **Comp Biochem Phys B.** 80: 327-335.
- Ewing, R.D., Clegg, J.S. (1972). Evidence for a single macromolecular form of lactate dehydrogenase in *Artemia salina*. **Arch Biochem Biophys.** 150: 566-572.
- Fanjul, M. (1998). **Biología Funcional de los Animales.** Siglo Veintiuno Editores. 1era Edición. España. p. 461.
- FAO. (2006). *Litopenaeus vannamei*. De [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus\\_vannamei/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/es). Recuperado el 8 de mayo del 2014.

- FAO, (2014). **Shrimp - June 2014** de <http://www.globefish.org/shrimp-june-2014.html>. Recuperado el 05 de marzo del 2015.
- Fevolden, S.E., Schneppenheim, R. (1988). Genetic population structure of *Euphausia superba* Dana in the Atlantic sector of the Southern Ocean as demonstrated by different electrophoretic techniques. **Polar Biol.** 9: 1-8.
- Gamble J. (1971). The Responses of the marine amphipods *Corophium renarium* and *C. volutator* to gradients and to choices of different oxygen concentrations. **J Exp Biol.** 54:275-290.
- Gay, R., McComb, R., Bowers, G. (1968). Dehydrogenase Isoenzymes as they affect total lactate dehydrogenase activity. **Clin Chem.** 8:740-753.
- GBC Group, (2011). **Camarón** de <http://www.gbcbiotech.com/genomicaypesca/especies/crustaceos/camaron.html>. Recuperado el 05 de marzo del 2015.
- Geihs M.A., Vargas M.A., Maciel F.E., Caldas S.S., Cruz B.P., Primel E.G., Monserrat J.M., Nery L.E. (2010). Effect of melatonin in the antioxidant defense system in the locomotor muscles of the estuarine crab *Neohelice granulata* (Decapoda, Brachyura). **Gen Comp Endocrinol.** 166:72–82.
- Gray J.S., Wu R., Or Y.Y. (2002). Effects of hypoxia and organic enrichment on the coastal marine environment. **Mar Ecol-Prog Ser.** 238:249-279.
- Hagerman, L., Sondergaard, T., Weile, K., Hosie, D., Uglow, R.F. (1990). Aspects of blood physiology and ammonia excretion in *Nephrops norvegicus* under hypoxia. **Comp Biochem Physiol A.** 97: 51–55.
- Herreid, C.F. (1980). Hypoxia in invertebrates. **Comp Biochem Phys A.** 67:311-320.
- Hill R.W., Wyse G., Anderson M. (2004). **Fisiología Animal**. Primera ed. Médica Panamericana S. A., Madrid.
- Hochachka P.W., Buck L.T., Doll C.J., Land S.C. (1996). Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 93:9493-9498.
- Hochachka, P. (1973) Strategies of Biochemical Adaptation. Cambridge University Edit. 1a Edición. Cambridge, UK. p. 358.
- Holeton G.F., Randall, D.J. (1967). The Effect of Hypoxia Upon the Partial Pressure of Gases in the Blood and Water Afferent and Efferent to the Gills of *Rainbow trout*. **J Exp Biol.** 46:317-327.
- Hussien, R., Brooks, G.A., (2011). Mitochondrial and plasma membrane lactate transporter and lactate dehydrogenase. **Physiol Genomics.** 43:255–264.
- IMPACT™ Kit. Protein purification system featuring fusion to C- or N- terminus of the target protein. Instruction Manual. Version 1.0. NEW ENGLAND, Biolabs<sup>inc.</sup>

- Jacobs, I. (1986). Blood Lactate: Implications for training and Sports Performance. **Sports Medicine**. 3:10-25
- Jobling, M. (1995) Environmental Biology of Fishes. Chapman and Hall Edit. 1a Edicion. London. P. 455.
- Johns G.C., Somero, G.N. (2004). Evolutionary convergence in adaptation of proteins to temperature: A<sub>4</sub>-lactate dehydrogenases of Pacific damselfishes (*Chromis* spp.) **Mol Biol Evol**. 21:314-320.
- Kang, D., Song, Y., Suh, M., Kang, C.(2002). Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Bull Korean Chem Soc**. 23: 1511-1512.
- Kanno, T., Sudo, K., Maekawa, M., Nishimura, Y., Ukita, M., Fukutake, K.(1988). Lactate dehydrogenase M-subunit deficiency: a new type of hereditary exertional myopathy. **Clin Chim Acta**. 173: 89–98.
- Karvonen, M.J. (1988). Prevention of cardiovascular disease among elderly. **Bull WHO**, 66: 7-14,
- Kayser, G., Kassem, A., Siemel, W., Schulte-Uentrop, L., Mattern, D., Aumann, K., Stickeler, E., Werner, M., Passlick, B., Zur-Hausen, A. (2010). Lactate-dehydrogenase 5 is overexpressed in non-small cell lung cancer and correlates with the expression of the transketolase-like protein 1. **Diagn Pathol**. 5: 22-30.
- Kinne O. (1970). Temperature: animals-invertebrates. **Mar Ecol**. 407-514.
- Klose, J., Hitzeroth, J., Ritter, H., Schmidt, E., Wolf, U. (1969). Persistence of maternal isoenzyme patterns of the lactate dehydrogenase and phosphoglucomutase system during early development of hybrid trout. **Biochem Genet**. 3: 91-97.
- Koolman, J. Rohm, K. (2005) Bioquímica Texto y Atlas. Ed. Medica Panamericana. 3a Edición. España.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227:680-685.
- Le, A., Cooper, C., Gouw, A., Dinavahi, R., Maitra, A. (2010). Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. **Proc Natl Acad Sci**. 107:2037–2042.
- Lemire, J., Mailloux, R.J., Appanna, V.D., (2008). Mitochondrial lactate dehydrogenase is involved in oxidative-energy metabolism in human astrocytoma cells (CCF-STTG1). **PLoS One**. 10:1371
- Lu, L., Wu, R.S.S. (2000). An experimental study on recolonization and succession of marine macrobenthos in defaunated sediment. **Mar Biol** 136, 291–302.

- Manchenko G. (1994) Detection of enzymes on electrophoretic gels. A Handbook. **CRC Press**. 440:38.
- Markert, C. L., Shaklee J. B., Whitt G. S. (1975). Evolution of a gene. Multiple genes for LDH isozymes provide a model of the evolution of gene structure, function and regulation. **Science**. 189: 102-114.
- Mathews, C., Van Holde, K. (1999). **Bioquímica**. Editorial McGraw-Hill, Interamericana. 2da Edición. Madrid, España. p.1258.
- Mayeda, K., Weiss, L., Lindahl, R., Dully, M. (1974). Localization of the human lactate dehydrogenase B gene on the short arm of chromosome 12. **J Hum Genet**. 26:59–64.
- Montoya, H. (2008). Microbiología básica para el área de la salud y afines. Editorial Universidad de Antioquia. 2da Edición. Colombia. p. 560
- Montoya-Rodríguez, A., López-Félix, S. (2000). Estandarización de técnicas moleculares para la detección de patógenos en organismos acuáticos. **En: Memorias del III Simposium Internacional de Acuicultura**. Mazatlán, Sin. Méx., del 5 al 7 de octubre. Pp. 263-279.
- Mulkiewicz, E., Zięta M. S., Stachowiak K., Skorkowski E. F. (2000). Properties of lactate dehydrogenase from the isopod, *Saduria entomon*. **Comp Biochem Physiol B**. 126: 337-346.
- Mulkiewicz, E., Zietara, M.S., Stromberg, J.O., Skorkowski, E.F. (2001). Lactate dehydrogenase from the northern krill *Meganyctiphanes norvegica*: comparison with LDH from the Antarctic krill *Euphausia superba*. **Comp Biochem Physiol B**. 128: 233-245.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**. 6: 255-62.
- Ochoa-Valdez, M.J. (2012). Sobreexpresión de la lactato deshidrogenasa recombinante de Camarón Blanco *Litopenaeus vannamei* y evaluación de la actividad enzimática. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México
- Paterson, B.D. (1993). The rise in inosine monophosphate and L-lactate concentrations in muscle of live penaeid prawns (*Penaeus japonicus*, *Penaeus monodon*) stressed by storage out of water. **Comp Biochem Physiol B**. 106:395-400.
- Pérez-Rostro, C. I., Racotta I. S., Ibarra A. M. (2004). Decreased genetic variation in metabolic variables of *Litopenaeus vannamei* shrimp after exposure to acute hypoxia. **J Exp Mar Biol Ecol**. 302:189-200.

- Pizzuto, R., Paventi, G., Porcile, C., Sarnataro, D., Daniele, A., Passarella, S. (2012). L-Lactate metabolism in HEP G2 cell mitochondria due to the l-lactate dehydrogenase determines the occurrence of the lactate/pyruvate shuttle and the appearance of oxaloacetate, malate and citrate outside mitochondria. **Biochim Biophys Acta.** 1817:1679–1690.
- Rabiu, S., Aliyu R., Wara, S., Aminu, M. (2013). Characterization and inhibition studies of lactate dehydrogenase isolated from chicken muscles by aqueous and ethanolic leaves extracts of *allium sativum* and *gossypium arboreum*. **Int J ChemTech Res.** 5: 322-341.
- Racotta, I.S., Palacios, E., Méndez, L. (2002). Metabolic responses to short and long-term exposure to hypoxia in white shrimp (*Penaeus vannamei*). **Mar Freshw Behav Physiol.** 35:269–275.
- Rasmussen, H.N., van Hall, G., Rasmussen, U.F. (2002). Lactate dehydrogenase is not a mitochondrial enzyme in human and mouse *vastus lateralis* muscle. **J Physiol.** 541:575–580.
- Rooney, C.H., Ferguson, A. (1985). Lactate dehydrogenase isozymes and allozymes of the nine-spined stickleback *Pungitius pungitius* (L.) (Osteichthyes, Gasterosteidae). **Comp Biochem Physiol B.** 81:711–715.
- Rosas, C., Martinez E., Gaxiola G., Brito R., Sánchez A., Soto L. A. (1999). The effect of dissolved oxygen and salinity on oxygen consumption, ammonia excretion and osmotic pressure of *Penaeus setiferus* (Linnaeus) juveniles. **J Exp Mar Biol Ecol.** 234:41-57.
- Rosenberg, R., Hellman, B., Johansson, B., (1991). Hypoxic tolerance of marine benthic fauna. **Mar Ecol-Prog Ser.** 79:127–131.
- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Peregrino-Uriarte, A.B., Hernández-López, J., Yepiz-Plascencia, G. (2006). Usage of energy reserves in crustaceans during starvation: status and future directions. **Insect Biochem Mol Biol.** 36: 241-249.
- Schuchard, M., Mehig, R., Kappel, W. (2002). ProteoSilver™: High Sensitivity Silver Stain for SDS-PAGE. Sigma-Aldrich
- Scislowski, P.W.D., Biegniewska, A., Zydowo, M. (1982). Lactate dehydrogenase from the abdomen and heart muscle of the crayfish *Orconectes limosus*. **Comp Biochem Physiol B.** 73: 697-699.
- Segel, H., Segel, E. (1976) Biochemical Calculations: How to solve mathematical problems in general biochemistry. John Wiley & Sons Edit. 1a Edicion. US
- Segel, H., Segel, E. (1993) Enzyme Kinetics: Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. John Wiley & Sons Edit. 1a Edicion. US.

- Semenza, G., Jiang, B., Leung, S., Passantino, R., Concordet, J., Maire, P., Giallongo, A. (1996) Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. **J Biol Chem.** 271: 32529-32537.
- Semenza G.L., Roth P.H., Fang H.M., Wang, G.L. (1994). Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. **J Biol Chem.** 269:23757-23763.
- Shoei-Lung, S. (1998). Structure, regulation and evolution of vertebrates lactate dehydrogenase genes. **Zool Stud.** 37:1-6.
- Soñanez-Organis, J. G., Peregrino-Uriarte A. B., Gómez-Jiménez S., López-Zavala A., Forman H. J., Yepiz-Plascencia G. (2009). Molecular characterization of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and tissue-specific expression under hypoxia. **Comp Biochem Phys C.** 150:395-405.
- Soñanez-Organis, J. G., Racotta I. S., Yepiz-Plascencia G. (2010). Silencing of the hypoxia inducible factor 1 –HIF-1- obliterates the effects of hypoxia on glucose and lactate concentrations in a tissue-specific manner in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **J. Exp Mar Bio Eco.** 393:51-58.
- 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.** 94:1250-1260.
- Stallknecht, D. E., Luttrell, M.P., Fischer, J.R., Kleven, S.H. (1998). Potential for transmission of the finch strain of *Mycoplasma gallisepticum* between huse finches. **Avian Dis.** 42:352-358.
- Stryer, L. (1996). **Bioquímica.** Editorial Reverté, S.A. 4ª Ed. Barcelona. p. 813.
- Sundt, R.C. Fevolden, S.E. (1996). Homogeneous genetic structure of *Meganyctiphanes norvegica* (Euphausiacea) in the north-east Atlantic Ocean, as interpreted from allozymic variation. **Sarsia.** 81:155-159.
- Swiderek, K., Paneth, P. (2011). Differences and similarities in binding of pyruvate and Lactate in the active site of M4 and H4 isoforms of human lactate dehydrogenase. **Arch Biochem Biophys** 505:33–41.
- Takayasu, S., Fujiwara, S., Waki, T. (1991). Hereditary lactate dehydrogenase M-subunit deficiency: lactate dehydrogenase activity in skin lesions and in hair follicles. **J Am Acad Dermatol** 24:339–342.
- Tang, H., Goldberg, E., (2009). Homo sapiens lactate dehydrogenase C (Ldhc) gene expression in cancer cells is regulated by transcription factor Sp1, CREB, and CpG island methylation. **J Androl** 30:157–167.



- Tanishima, K., Xian, S., Yamamoto, R., Yoshida, H. (1995). Biochemical and enzymological study of lactate dehydrogenase isoenzymes from commercial quality control sera and several animal tissue sources. **Eur J Clin Chem Clin Biochem.** 33: 865-868.
- Taylor, A.C., Spicer, J.I., (1987). Metabolic responses of the prawns *Palaemon elegans* and *Palaemon serratus* (Crustacea: Decapoda) to acute hypoxia and anoxia. **Mar Biol** 95: 521–530.
- Thebault, M.T., Bernicard, A., Lennon, J.F. (1981). Lactate dehydrogenase from caudal muscle of the shrimp *Palaemon serratus*: purification and characterization. **Comp Biochem Physiol B.** 68: 65-70.
- Thebault, M.T. (1983). Interacting effect of temperature and pH on the catalytic properties of lactate dehydrogenase from *Palaemon serratus*. **Mol Physiol** 331-338.
- Tsoi, S.C.M., Li, S.S.L. (1994). The nucleotide and deduced amino-acid sequences of A cDNA encoding lactate dehydrogenase from *Caenorhabditis elegans*: the evolutionary relationships of lactate dehydrogenases from mammals, birds, amphibian, fish, nematode, plants, bacteria, mycoplasma, and plasmodium. **Biochem Biophys Res Com.** 205: 558-564.
- Villarreal, H., Hinojosa P., Naranjo, J. (1994). Effect of temperature and oxygen consumption of laboratory produced *Penaeus vannamei* postlarvae. **Comp Biochem Physiol B.**108:331-336.
- Voet, D., Voet, J.G. (2006). **Bioquímica.** Tercera ed. Médica Panamerica Buenos Aires.
- Whitt, G. S. (1981). Developmental Genetics of Fishes: Isozymic Analyses of Differential Gene Expression. **Integr Comp Biochem.** 21: 549-572.
- Worthington, C.C. (1988). Worthington enzyme manual: enzymes and related biochemicals **Worthington Biochemical Corporation.**
- Wu, R.S.S., (1999). Eutrophication, trace organics and water-borne pathogens: pressing problems and challenge. **Mar Pollut Bull.**39:11–22
- Wu R.S.S. (2002). Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. **Mar Pollut Bull.** 45:35-45.
- Yoshida, M., Ishikawa, K. Kitamura, M. (1966). Studies on lactate dehydrogenase isozymes of body fluids (I), an improved method of agar-gel electrophoresis on microscope slides. **Seibutsu-butsumi-kagaku.** 11:69–74.
- Yoshikawa, T., Murata O., Furuya K., Eguchi M. (2007). Short-term covariation of dissolved oxygen and phytoplankton photosynthesis in a coastal fish aquaculture site. **Estuar Coast Shelf S.** 74: 515-527.
- Zhang, P., Zhang X., Li J., Huang G. (2006). The effects of body weight, temperature, salinity, pH, light intensity and feeding condition on lethal DO levels of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). **Aquaculture.** 256: 579-587.

- Zenteno-Savín, T., Saldierna R., Ahuejote-Sandoval M. (2006). Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp. **Comp Biochem Phys C.** 142:301-308.
- Zietara, M., Gronczewska J., Stachowiak K., Skorkowski E. (1996). Lactate dehydrogenase in abdominal muscle of crayfish *Orconectes limosus* and shrimp *Crangon crangon* (Decapoda: Crustacea): Properties and evolutionary relationship. **Comp Biochem Physiol B.**114: 395-401.