



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**ESTUDIO DE LAS SUBUNIDADES α Y β DE LA
PORCIÓN CATALÍTICA DEL COMPLEJO
MITOCONDRIAL F₀F₁ATP-SINTASA DEL CAMARÓN
Penaeus vannamei: caracterización del ADNc y evaluación
del efecto de la hipoxia en la expresión génica de ambas
subunidades**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos
Naturales
(Orientación en Biotecnología)

p r e s e n t a

Arlett Robles Romo

La Paz, B.C.S. Enero de 2009

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 26 del Mes de Enero del 2009, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Estudio de las subunidades α y β de la porción catalítica del complejo mitocondrial F_0F_1 ATP-sintasa del camarón *Penaeus vannamei*: caracterización del ADNc y evaluación del efecto de la hipoxia en la expresión génica de ambas subunidades"

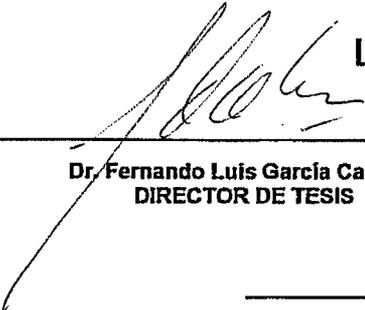
Presentada por el alumno:

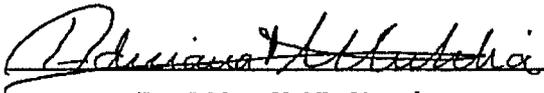
Arlett Robles Romo

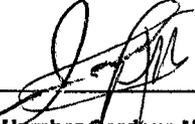
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA


Dr. Fernando Luis García Carreño
DIRECTOR DE TESIS


Dra. Adriana Muhlia Almazán
CO-TUTOR


Dr. Julio Humber Gordova Murueta
CO-TUTOR


DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Comité tutorial

Dr. Fernando Luis García Carreño. Director de tesis (CIBNOR-La Paz, B.C.S)

Dra. Adriana Muhlia Almazán. Cotutor (CIAD-Hermosillo, Sonora)

Dr. Julio Humberto Córdova Murueta. Cotutor (CIBNOR-La Paz, B.C.S)

Comité revisor

Dr. Fernando Luis García Carreño.

Dra. Adriana Muhlia Almazán.

Dr. Julio Humberto Córdova Murueta.

Jurado de examen

Dr. Fernando Luis García Carreño.

Dra. Adriana Muhlia Almazán.

Dr. Julio Humberto Córdova Murueta.

Suplente: Dra. Martha Patricia Hernández Cortés (CIBNOR-La Paz, B.C.S)

RESUMEN

La enzima multimérica F_0F_1 ATP-sintasa cuya función es la síntesis/ hidrólisis de ATP, provee aproximadamente el 95% del ATP que se sintetiza en la célula para cumplir sus funciones. Su función es muy importante en cualquier sistema vivo. En crustáceos existe poca información sobre su estructura y función, por lo que es considerada un objeto de estudio importante.

A lo largo de su ciclo de vida los camarones se exponen con frecuencia a ambientes hipóxicos, por lo que las respuestas fisiológicas van desde la búsqueda de lugares con mayor concentración de oxígeno, hasta la reorganización del metabolismo y cambio a anaerobiosis como vía alterna para la síntesis de ATP.

El objetivo de este trabajo fue abordar el estudio del complejo mitocondrial F_0F_1 ATP-sintasa del camarón *Penaeus vannamei*, partiendo de la caracterización de las secuencias de ADN complementario de las dos subunidades que se encuentran directamente involucradas en el proceso catalítico de la enzima, $ATP\alpha$ y $ATP\beta$, así como conocer el patrón de cambio en la concentración de ARNm de ambas subunidades, en branquias y en pleópodos, bajo condiciones de hipoxia. La secuencia del ADNc de cada subunidad fue obtenida y analizada usando técnicas de biología molecular y bioinformáticas, mientras que la evaluación de la concentración de ARNm de los transcritos $ATP\alpha$ y $ATP\beta$ en las branquias y los pleópodos de camarones en hipoxia por PCR cuantitativa.

En el caso del ADNc de $ATP\alpha$, la secuencia obtenida consta de 1653 pb y es 83% similar a la secuencia de nucleótidos de $ATP\alpha$ de *Salmo salar*, mientras que la del ADNc de $ATP\beta$ obtenida fue de 1823 pb y 82% similar a la secuencia nucleotídica de $ATP\beta$ del langostino *Pacifastacus leniusculus*, en ambas secuencias se identificaron el codón de inicio y de término, así como las regiones conservadas. En las branquias se observó que la cantidad del transcrito de $ATP\alpha$ fue hasta 119 y 128 veces mayor en los organismos sometidos a hipoxia (4 y 2 mg/L de oxígeno disuelto) que en aquellos en normoxia (6 mg/L) y la concentración del ARNm de $ATP\beta$ fue 3 veces mayor en 4 mg/L que en normoxia. En los pleópodos, al comparar con lo encontrado en normoxia, el ARNm de $ATP\alpha$ aumentó 15 veces y el de $ATP\beta$ 43 veces en camarones expuestos a 1.5 mg/L. Los resultados sugieren regulación durante la transcripción de ambas subunidades, en función del estado metabólico de los tejidos.

Palabras clave: F₀F₁ATP-sintasa, subunidad α , subunidad β , hipoxia, *P. vannamei*.

ABSTRACT

F₀F₁ATP-synthase is a multi-meric enzyme that catalyzes the synthesis or hydrolysis of ATP. It synthesizes 95% of cellular ATP in mitochondria. The function of the enzyme is important in all organisms. In their lifecycle, shrimp are often exposed to hypoxia. The response to hypoxia in crustaceans includes avoidance behavior and metabolic reorganization. This study attempts to characterize F₀F₁ATP-synthase in shrimp, a topic on which there is scarce information, using the whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* as the test species. The nucleotide sequence of F₀F₁ATP-synthase subunits α and β were obtained by molecular biology techniques and the amount of mRNA of both subunits in gills and pleopods of shrimp exposed to hypoxia was evaluated by quantitative PCR. The cDNA sequence obtained from *ATP α* transcript was 1653 pb long and was 83% similar to the sequence of the corresponding subunit in the Atlantic salmon *Salmo salar*. The cDNA sequence of *ATP β* was 1823 pb long and 82% similar to the sequence of the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus*. In gills, a higher concentration of mRNA of *ATP α* was found in shrimp exposed to 4 and 2 mg/l dissolved oxygen than in shrimp exposed to normal levels (6 mg/l). The concentration of mRNA of *ATP β* was three times higher in shrimp exposed to 4 mg/l, than in shrimp exposed to 6 mg/l. In pleopods, the amount of mRNA of *ATP α* and *ATP β* was higher in shrimp exposed to 1.5 mg/l than in shrimp exposed to 6 mg/l. Results suggest a regulation of transcription of the two subunits according to the metabolic state of the tissues.

Keywords: F₀F₁ATP-synthase, subunit α , subunit β , hypoxia, *P. vannamei*

DEDICATORIA

A María Dolores, Gustavo, Jeaneth y Ariana.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por la beca número 206358 otorgada durante el desarrollo de la tesis de maestría.

Al comité tutorial

Dr. Fernando García Carreño

Dra. Adriana Muhlia Almazán

Dr. Julio Humberto Córdova Murueta

Al personal del laboratorio de Bioquímica en CIBNOR por las facilidades y apoyo otorgados para el desarrollo del trabajo así como al personal del LBMOA en CIAD por haber brindado espacio, tiempo y recursos para el desarrollo de parte del trabajo experimental.

Al personal de Posgrado y compañeros de maestría.

A Carmen Contreras, José Guadalupe Soñanez, Nadiezhda Cantú, Raúl Llera, Joseph Roblero, Irlanda Lagarda, Emmanuel Aispuro, Sergio Vega, Gracia Gómez y Rodolfo Garza por el apoyo brindado para el desarrollo del trabajo.

A familiares, amigos y compañeros por las experiencias compartidas durante los últimos años.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	4
2. ANTECEDENTES	7
2.1 La Mitocondria	7
2.1.1 Proteínas nucleares en la mitocondria	7
2.1.3 La cadena respiratoria.....	8
2.2 La Hipoxia	13
2.2.1 Respuestas generadas por condiciones de hipoxia	17
2.3 Generalidades de los peneidos.....	18
2.4 El Sistema Respiratorio de los peneidos.....	19
2.5 El Sistema Circulatorio de los Peneidos	20
3. HIPÓTESIS	22
4. OBJETIVOS	23
4.1 Objetivo general.....	23
4.2 Objetivos específicos	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1 Extracción y cuantificación del ARN total	24
5.2 Obtención de la secuencia del ADNc de las subunidades α y β	24
5.4 Eliminación de ADN genómico.....	28
5.5 Síntesis del ADNc.....	29
5.6 Amplificación de los fragmentos de $ATP\alpha$ y $ATP\beta$	29
5.7 Cuantificación del ARNm de $ATP\alpha$ y $ATP\beta$ por PCR cuantitativo.....	30
5.8 Análisis estadístico	31
6. RESULTADOS	32
6.1 Secuencia del ADNc de $ATP\alpha$ de <i>P. vannamei</i>	32
6.2 Secuencia del ADNc de $ATP\beta$ de <i>P. vannamei</i>	37
6.3 Evaluación de los transcritos de $ATP\alpha$ y $ATP\beta$ por PCR cuantitativa.....	45
6.3.1 Integridad del ARN total.....	46
6.3.2 Degradación de ADN genómico presente en las muestras de ARN total.....	47
6.3.3 Síntesis de ADNc y amplificación por PCR de $ATP\alpha$ y $ATP\beta$	47
6.3.4 Cuantificación del ARNm de $ATP\alpha$ y $ATP\beta$ por PCR cuantitativa.....	48
7.2 Concentración del ARNm de $ATP\alpha$ y $ATP\beta$ en hipoxia.....	54
7.2.2 Pleópodos.....	57
8. CONCLUSIONES	63
9. REFERENCIAS	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura tridimensional de la subunidad α de la F_0F_1 ATP-sintasa de <i>B. taurus</i> .	12
Figura 2. Estructura tridimensional de la subunidad β de la F_0F_1 ATP-sintasa de la bacteria termofílica <i>Bacillus</i> PS3.	13
Figura 3. A) Sistema circulatorio, B) branquias y C) pleópodos de organismos del género <i>Penaeus</i> .	21
Figura 4. Ubicación de los oligonucleótidos utilizados para la obtención de la secuencia del ADNc de A) $ATP\alpha$ y B) $ATP\beta$ de <i>P. vannamei</i> .	27
Figura 5. Secuencia parcial del ADNc de $ATP\alpha$ y la secuencia deducida de aminoácidos del camarón blanco <i>P. vannamei</i> .	33
Figura 6. Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia del ADNc de $ATP\alpha$ de <i>P. vannamei</i> con la secuencia de aminoácidos de $ATP\alpha$ de otros organismos.	37
Figura 7. Secuencia del ADNc de $ATP\beta$ y la secuencia deducida de aminoácidos del camarón blanco <i>P. vannamei</i> .	39
Figura 8. Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia obtenida del ADNc de $ATP\beta$ de <i>P. vannamei</i> con $ATP\beta$ de otros organismos.	42
Figura 9. Integridad del ARN total.	46
Figura 10. Evaluación de las muestras de ARN total con ADN genómico.	47
Figura 11. Fragmentos amplificados de $ATP\beta$ de 205 pb a partir del ADNc de 5 diferentes muestras de pleópodos del camarón blanco <i>P. vannamei</i> .	48
Figura 12. Cuantificación relativa de A) $ATP\alpha$ y B) $ATP\beta$ en las branquias de <i>P. vannamei</i> .	50
Figura 13. Cuantificación relativa de A) $ATP\alpha$ y B) $ATP\beta$ en los pleópodos de <i>P. vannamei</i> .	51

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Características de los oligonucleótidos específicos utilizados como iniciadores en las reacciones de PCR.....	26
Tabla II. Tiempo transcurrido a lo largo del bioensayo del que se obtuvieron las muestras para la evaluación de la concentración de ATP α y ATP β en las branquias y los pleópodos de <i>P. vannamei</i>	45
Tabla III. Características de las curvas estándar construidas para la cuantificación de los transcritos por PCR cuantitativa.	49

1. INTRODUCCIÓN

Casi todas las funciones celulares están acopladas a la hidrólisis de adenosin-trifosfato o ATP para que las células, tejidos, órganos y organismos puedan permanecer en un estado metabólico estable pues deben mantener un balance entre todas aquellas reacciones que demandan ATP y las que lo sintetizan (Hochachka y Somero, 2002). Una de las enzimas que proveen ATP a las células como producto del catabolismo aerobio es la FoF1ATP-sintasa (EC 3.6.3.14), un complejo enzimático que forma parte de la cadena respiratoria presente en las mitocondrias. Esta enzima sintetiza alrededor del 95% de ATP en la célula y por su función está ligada a la presencia del oxígeno, por lo que la FoF1ATP-sintasa juega un papel fundamental en la reorganización del metabolismo celular (Alberts *et al.*, 2008). La porción F1 de la FoF1ATP-sintasa de *Escherichia coli* está formada por 5 subunidades α , β , γ , δ y ϵ . (Boyer, 1997). Las subunidades α y β forman parte del subcomplejo donde se encuentra el sitio catalítico. Las subunidades por las cuales está formada esta enzima, están codificadas algunas en el ADN mitocondrial (subunidades 6 y 8) y el resto en el ADN nuclear lo cual le da un grado de complejidad, ya que la formación de los complejos de la FoF1ATP-sintasa implica el ensamblaje de subunidades codificadas en dos genomas físicamente separados (Breen, 1988; Wallace *et al.*, 1987). Por lo tanto la actividad de la FoF1ATP-sintasa puede estar regulada desde la transcripción de cada una de sus subunidades hasta la posible inhibición de la enzima, y se ha sugerido que la regulación de la transcripción es distinta para las subunidades que componen al complejo, por lo que la formación de un complejo de FoF1ATP-sintasa es un proceso altamente complejo (Alberts *et al.*, 2008).

En relación al estudio de las subunidades catalíticas, las cuales se localizan en la porción F_1 , en organismos como los crustáceos existe poca información. No existe una secuencia reportada de la subunidad α y solo una secuencia del ARNm de la subunidad β de la F_0F_1 ATP-sintasa del langostino *Pacifastacus leniusculus* (no. de acceso en Genbank DQ874396). El estudio de la F_0F_1 ATP-sintasa en crustáceos como el camarón *Penaeus vannamei* resulta interesante debido a que este no es un organismo modelo de estudio y también a las características de su biología, por lo que la F_0F_1 ATP-sintasa de crustáceos pudiera presentar características especie específicas. El camarón blanco *P. vannamei* a lo largo de su ciclo de vida se ve expuesto a diferentes condiciones, entre las cuales están las distintas concentraciones de oxígeno en el agua. Este organismo durante su desarrollo larvario y etapa juvenil habita zonas estuarinas someras, cuyas aguas presentan concentraciones de oxígeno cambiantes debido a las altas concentraciones de materia orgánica y a la poca circulación de agua. Además los camarones en algunas etapas de su ciclo de vida permanecen enterrados en el sedimento marino en donde las concentraciones de oxígeno son reducidas (Dall *et al.*, 1990).

La disminución de la concentración de oxígeno afecta a los organismos aerobios a nivel fisiológico y metabólico, por lo que algunas especies presentan adaptaciones a la hipoxia (Flück *et al.*, 2007; Webster, 2003), estas respuestas dependen de factores como el hábitat y el tipo de actividad física del organismo (Flück *et al.*, 2007). Para estudiar el fenómeno de la hipoxia se han utilizado como modelos de estudio algunas especies de anfibios (*Rana temporaria*) y reptiles como las tortugas acuáticas (*Chrysemys picta* y *Trachemys scripta elegans*) ya que sobreviven a periodos prolongados de concentraciones bajas de oxígeno.

Los crustáceos acuáticos son otro ejemplo de adaptabilidad fisiológica a cambios cíclicos en el ambiente, por lo que cuentan con estrategias metabólicas que les permiten desarrollarse en dichas condiciones (Pannunzio y Storey, 1998). Una de las razones a las que se atribuye esta adaptabilidad es la plasticidad de su sistema respiratorio (Bridges, 2001).

El proceso para generar respuestas ante la hipoxia, comienza con la detección de una disminución de la concentración de oxígeno, ignorándose a la fecha el mecanismo celular de detección, aunque se cree está relacionado con la ruta de las prolil-hidroxilasas (PHD por sus siglas en inglés “prolyl hydroxylase”). Se han identificado factores de transcripción como el factor inducible por hipoxia (HIF por sus siglas en inglés “hypoxia inducible factor”) el cual controla de forma positiva en los eucariotes la transcripción de genes relacionados con la glucólisis. Así, el objetivo del presente trabajo fue estudiar las secuencias de los ADNc de las subunidades α y β de la F_0F_1 ATP sintasa y conocer la concentración de estos en el camarón blanco *P. vannamei* bajo condiciones de hipoxia, lo anterior en busca de sentar las bases que permitieran un avance en el estudio de las subunidades α y β de la F_0F_1 ATP-sintasa de el camarón *P. vannamei*.

2. ANTECEDENTES

2.1 La Mitocondria

Existen dos vías metabólicas por las que se sintetiza la molécula energética ATP, una por fosforilación a nivel sustrato y la otra es a través de la fosforilación oxidativa. Esta última en los eucariotes ocurre en organelos como las mitocondrias y los cloroplastos. En la fosforilación a nivel sustrato durante la glucólisis se sintetizan 2 moléculas de ATP, mientras que la fosforilación oxidativa son sintetizadas 30 moléculas (Alberts *et al.*, 2008). La mitocondria es un organelo que se diferencia del resto en varios aspectos, debido principalmente a que contiene su propia información genética. En este organelo ocurre la síntesis del 95% del ATP celular a través de la fosforilación oxidativa en condiciones de normoxia, razón por la cual este organelo consume el 90% del oxígeno. La fosforilación oxidativa se lleva a cabo gracias al gradiente electroquímico que se forma entre la membrana interna y la matriz mitocondrial, siendo el mantenimiento del gradiente electroquímico y el bombeo de protones los procesos de mayor importancia en la mitocondria con respecto al mantenimiento de la célula (Bernardi, 1999). La mitocondria participa en procesos celulares como la apoptosis, el transporte de Ca^{+2} para mantener la homeostasis, la señalización celular, la β -oxidación, la biosíntesis de pirimidinas, aminoácidos, fosfolípidos, nucleótidos, ácido fólico, urea y grupos hemo, así como en la producción de radicales libres, entre otros (Devin y Rigoulet, 2007).

2.1.1 Proteínas nucleares en la mitocondria

La mitocondria importa la mayoría de sus componentes macromoleculares desde el citoplasma, entre ellos proteínas codificadas en el ADN nuclear, algunas de los cuales

deben ser importadas y ensambladas en la mitocondria, por lo que son sintetizadas como precursores, y para que tales precursores sean importados a la mitocondria es necesaria la hidrólisis de ATP y un gradiente de protones en la membrana interna (Lodish *et al.*, 1995). Los precursores son dirigidos a distintos lugares de la mitocondria, las subunidades nucleares de la F_0F_1 ATP-sintasa por ejemplo son transportadas como precursores hasta la matriz mitocondrial, posteriormente el péptido señal es removido y por último se insertan en la membrana interna (para el caso de F_0) una vez que se asocian con el resto de las subunidades que forman esta porción del complejo, los detalles de este proceso son desconocidos (Lodish *et al.*, 1995).

2.1.3 La cadena respiratoria

La respiración celular en eucariotes se realiza en la mitocondria por la cadena respiratoria (Figura 1). La mitocondria exporta ATP y dióxido de carbono hacia el citoplasma, e importa ADP, fosfato inorgánico, oxígeno y piruvato. Estas moléculas son necesarias para la fosforilación oxidativa. En este proceso las moléculas acarreadoras de electrones, producto del catabolismo, donan sus electrones a los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria (Lodish *et al.*, 1995). De forma general la respiración celular consiste en una serie de reacciones de oxido-reducción a través de la cadena respiratoria, la cual está compuesta de 5 complejos embebidos en la membrana interna de la mitocondria, la NAD deshidrogenasa (complejo I), la succinato coenzima Q reductasa también denominada succinato deshidrogenasa (complejo II), el citocromo *bc₁* (complejo III), la citocromo c oxidasa (complejo IV) y la F_0F_1 ATP-sintasa (complejo V) (Ballard *et al.*, 2004; Alberts *et al.*, 2008).

Se han encontrado cambios en la transcripción de los genes codificados ya sea en el ADN mitocondrial o en el ADN nuclear de proteínas que forman parte de los complejos enzimáticos que participan en la fosforilación oxidativa (Hevner *et al.*, 1993; Wallace, 2005). Mehrabian *et al.*, (2005) sugirieron que la mitocondria detecta disminuciones en la concentración de ATP e incrementos de ADP y AMP lo cual estimula la transcripción y traducción de las subunidades codificadas en el ADN mitocondrial. Estos cambios provocan el importe e integración de las subunidades codificadas en el núcleo. Se han encontrado cambios en la cantidad de los transcritos de las subunidades de algunos de los complejos de la cadena respiratoria, en *Cyprinus Carpio* por ejemplo se encontró una cantidad mayor del ARNm de las subunidades α , β , γ , c y 6 de la F₀F₁ATP-sintasa, así como de la citocromo b y de la subunidad II de la citocromo c oxidasa, en organismos expuestos a 10 °C con respecto a los expuestos a 30 °C. La mayor cantidad de los transcritos de la F₀F₁ATP-sintasa coincidió con una mayor actividad enzimática en los organismos expuestos a 10 °C (Itoi *et al.*, 2002). Con respecto a camarones, existen pocos trabajos los cuales se han realizado recientemente, por ejemplo en el camarón *Palaemonetes pugio* se ha encontrado que en condiciones de 1.5 mg/L de oxígeno disuelto (OD) por 3 días ocurre un aumento significativo de la cantidad de transcritos de la citocromo c oxidasa I (*Ccox1*), citocromo oxidasa III (*Ccox3*), y de la citocromo b (*cytb*) (Brouwer *et al.*, 2008). Mientras que 7 días en hipoxia tienen como efecto una disminución en la cantidad de los transcritos de la subunidad d de la F₀F₁ATP-sintasa en el mismo organismo *P. pugio* (Brown-Peterson *et al.*, 2008). Con respecto a *P. vannamei* se han estudiado tan solo 2 subunidades, en el mismo trabajo se obtuvieron las secuencias de las subunidades 9 y 6 de la F₀F₁ATP-sintasa y fue reportado que la concentración de los

transcritos de ambas subunidades 9 y 6 de la F_0F_1 ATP-sintasa variaron a lo largo del periodo de muda que experimenta este organismo (Muhlia-Almazán *et al.*, 2008).

2.1.3.1 F_0F_1 ATP-sintasa

La ATP-sintasa del tipo F es la enzima responsable de la síntesis de ATP, sin embargo en concentraciones bajas de oxígeno ó anoxia, la enzima funciona como hidrolasa (Di Lisa *et al.*, 1998). La F_0F_1 ATP-sintasa pertenece a la clase de las F-ATPasas (EC 3.6.3.14), está formada por un mosaico de subunidades globulares, siendo estas unidades funcionales. (Domínguez-Ramírez y Gómez-Puyou, 2005). La F_0F_1 ATP-sintasa está formada por una porción hidrofóbica F_0 y otra hidrofílica F_1 , ambas conectadas por una proteína que sirve como eje central, la síntesis de ATP por parte de esta enzima se lleva a cabo gracias a un proceso que transforma la energía del gradiente de protones en energía química de enlace, entre ADP y Pi. Lo anterior sucede a través de la acción sucesiva de las dos porciones que forman a la F_0F_1 ATP-sintasa. La porción F_0 se encuentra embebida en la membrana interna de la mitocondria y está formada en *E. coli* por las subunidades *a*, *b* y *c*, mientras que la porción F_1 se localiza en la matriz mitocondrial y como ya se mencionó está formada por las subunidades α , β , γ , δ y ϵ . (Futai *et al.*, 1988). El mecanismo de catálisis de la F_0F_1 ATP-sintasa se describe a continuación:

Los protones del espacio intermembranal son translocados a través de F_0 hacia la matriz mitocondrial, el proceso de la translocación provoca el giro del rotor formado por las subunidades *c* de la porción F_0 . El paso de los protones a través de la enzima provoca la rotación de la subunidad γ presente en la porción F_1 , el giro de la subunidad γ genera

cambios conformacionales sucesivos en el subcomplejo formado por las subunidades α y β donde están presentes los sitios catalíticos, es entonces cuando ocurre la síntesis de ATP (Hsin-Chen y Yau-Huei, 2000). La F_0F_1 ATP-sintasa de *E. coli* se ha tomado como modelo para el estudio estructural y funcional de la enzima por la sencillez de la estructura y por las bondades que implica trabajar con este organismo, pues las 8 subunidades que la conforman se encuentran codificadas en un solo operón. Mientras que en eucariontes, los genes que codifican las más de 15 diferentes subunidades, se encuentran algunos en el núcleo y otros en la mitocondria. La porción F_1 del complejo está formada por un tallo central y por un anillo hexamérico formado por las subunidades α y β , el cual representa más del 80% de la masa molecular de esta porción (Domínguez-Ramírez y Gómez-Puyou, 2003). En células animales esta porción tiene una masa molecular de 371 kDa (Catterall *et al.*, 1971).

La subunidad α (Figura 1) de *E. coli*, presenta una similitud del 50% en su secuencia de aminoácidos con la de *B. taurus* (Futai *et al.*, 1988). A la subunidad α se le atribuye una función estructural ya que los sitios catalíticos presentes en la subunidad β se encuentran en la región donde interactúa con la subunidad α . Por lo que los sitios de unión de nucleótidos de ATP α no son catalíticos (Falson *et al.*, 2004). La subunidad β , al igual que la subunidad α , está codificada en el ADN nuclear en bovinos, levaduras y bacterias (Domínguez-Ramírez y Gómez-Puyou, 2005). La proteína tiene una masa molecular de 55 kDa, y está compuesta de alrededor de 500 aminoácidos (Falson *et al.*, 2004). En células animales la subunidad α es sintetizada como un precursor, el cual contiene en la parte del amino terminal un péptido que es procesado o removido cuando esta es transportada a la

mitocondria. La parte de la secuencia que es removida contiene solo aminoácidos básicos y es menos conservada que la proteína madura (Takeda *et al.*, 1986). Está formada de tres dominios, designados como, el amino terminal, el sitio de unión a nucleótidos y el carboxilo terminal (Takeda *et al.*, 1986). En relación a la información disponible sobre la subunidad α se conoce solo un EST de *P. vannamei* (no. de acceso en GenBank BF024234).



Figura 1. Estructura tridimensional de la subunidad α de la F_0F_1 ATP-sintasa de *B. taurus* (Modificada de Futai, 2006).

La subunidad β se encuentra localizada formando un subcomplejo en forma de anillo, integrado por tres subunidades β y tres subunidades α , estando cada subunidad β seguida por una subunidad α . En la subunidad β se encuentran los sitios catalíticos de síntesis e hidrólisis de ATP. En esta subunidad se encuentran los sitios de unión a nucleótidos que participan en la catálisis. El mecanismo de catálisis ocurre por cambios conformacionales sucesivos que ocurren en la subunidad β , como resultado de la translocación de protones. Estos cambios dan resultado tres diferentes estados que corresponden a una baja, media y

alta afinidad por nucleótidos (Stock *et al.*, 1999). La subunidad β es la que presenta mayor de conservación entre los diferentes organismos, en comparación con el resto de las subunidades de la F_0F_1 ATP-sintasa (Boyer, 1997). La similitud de secuencias de aminoácidos entre la subunidad β de *E. coli* y la de los cloroplastos de la espinaca es de 65% (Runswick y Walker, 1983). Una vez traducido el ARNm en el citoplasma la preproteína resultante es importada a la matriz mitocondrial (Egea *et al.*, 1997). La subunidad β tiene una masa molecular de 50 kDa y está compuesta por alrededor de 500 aminoácidos. Está formada de tres dominios, designados como, el amino terminal, el sitio de unión a nucleótidos y el carboxilo terminal (Yagi *et al.*, 1999) (Figura 2). Con respecto a la subunidad β de *P. vannamei* aún no se tiene información.

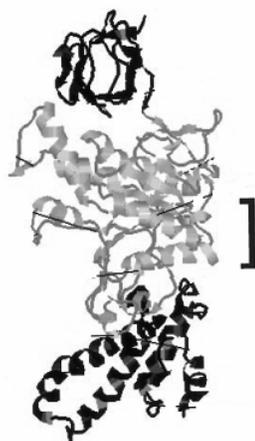


Figura 2. Estructura tridimensional de la subunidad β de la F_0F_1 ATP-sintasa de la bacteria termofílica *Bacillus PS3*. De arriba hacia abajo, se muestran en escala de gris el dominio amino terminal, el dominio de unión a nucleótidos y el dominio carboxilo terminal. Se señala con un corchete la parte de la región responsable de los cambios conformacionales (Yagi *et al.*, 1999).

2.2 La Hipoxia

La disminución de oxígeno en el medio ambiente provoca estrés en los organismos, lo cual activa los sistemas metabólicos de respuesta. Los límites de tolerancia a diferentes tipos de estrés son impuestos por la genética del organismo, mientras que la capacidad de respuesta está en función de la plasticidad fenotípica del organismo y del tiempo que esté expuesto a las condiciones de estrés. Si los organismos se encuentran en condiciones de estrés que superan los límites de tolerancia, se compromete la supervivencia del organismo. Así el que un organismo pueda enfrentar circunstancias adversas es el resultado de la suma de la interacción de diversos factores, que pueden ir desde la modulación de los sistemas bioquímicos que operan en la célula a ajustes en el funcionamiento de distintos sistemas de órganos (McMahon, 2001; Hochachka y Monge, 2000).

No existe a la fecha una terminología universal que sea aceptada para describir condiciones deficientes de oxígeno (Tyson y Pearson, 1991). Hipoxia es un término utilizado por los fisiólogos para describir condiciones que provocan estrés por concentraciones deficientes de oxígeno. De forma general se maneja el término hipoxia como sinónimo de baja concentración de oxígeno, siendo el significado de “baja concentración” distinto y específico para la especie de la que se trate, utilizándose también para referirse a la concentración de oxígeno por debajo de la normal para determinado organismo. La ausencia de oxígeno es conocida como anoxia, mientras que normoxia es la concentración de oxígeno ambiental adecuada para el desarrollo del organismo (Rabalais *et al.*, 2002). Los organismos marinos pueden encontrarse en ambientes hipóxicos debido a diversas razones como la estratificación de la columna de agua, procesos de eutrofización (Rabalais *et al.*, 2002), efecto del viento o de las mareas en aguas someras, entre otras (Bell *et al.*, 2003).

Además pueden presentarse diferencias diarias en la concentración de oxígeno debido al consumo y liberación de oxígeno por la fotosíntesis, lo cual obedece al patrón de las horas luz del día (Ringwood y Keppler, 2002; Tyler y Targett, 2007).

Los crustáceos, al menos aquellos que pertenecen a la clase de los malacostraca pueden tolerar la hipoxia, especies como el isópodo marino *Saduria entomon* (Hagerman y Szaniawska, 1994) y la *Artemia franciscana* (Clegg, 1997) sobreviven a anoxia. Mientras que los camarones de las especies *P. vannamei* y *P. monodon* (Seidman y Lawrence, 1985) toleran condiciones de hipoxia. Con respecto a la tolerancia de *P. vannamei* a la hipoxia, en condiciones experimentales se ha reportado que sobrevive 1 día a 1 mg/L OD (Zenteno-Savín, *et al.*, 2006), sobrevive por 2 semanas a 2 mg/L de OD (Racotta *et al.*, 2002) y 46 días a 2.5 mg/L de OD (Brouwer *et al.*, 2007). También se han reportado como letales las concentraciones entre 0.2, 0.4 y 1 mg/L de OD para distintas especies de peneidos, *Penaeus japonicus*, *Penaeus schmitti*, *Penaeus monodon* y *P. vannamei* (Egusa, 1961; Liao y Huang, 1975; Hopkins *et al.*, 1991). Las diferencias entre los reportes sobre la tolerancia de *P. vannamei* a diferentes concentraciones de OD radica en el estado en el que se encuentran los organismos así como las diferentes condiciones ambientales bajo las cuales se llevan a cabo los experimentos. En el estudio realizado en el 2006 por Zhang *et al.*, se evaluaron diferentes concentraciones de OD para determinar la dosis letal media de *P. vannamei* en condiciones de hipoxia y distintas variables como temperatura, salinidad, pH, estadio de muda, actividad física y hora del día. Como resultado de la investigación realizada se encontró que todas las variables antes mencionadas determinan el efecto de la hipoxia, y

que las condiciones óptimas controladas son 22 °C, 16.6% de salinidad, pH 7.56, y periodos de luz de duración más larga que los periodos de oscuridad.

Debido a que la falta de oxígeno afecta directamente la principal vía de síntesis de ATP en todos los eucariotes, no resulta extraño que estos hayan desarrollado la capacidad de responder a condiciones de hipoxia a través de la regulación génica, dicho efecto sobre el transcriptoma celular ha sido revelado por diversos estudios. A la fecha se sabe que los genes regulados por la hipoxia son aquellos cuyos productos participan en procesos como la angiogénesis, y síntesis de ATP por vía anaerobia. Se han identificado diferentes factores de transcripción que controlan la expresión de genes en condiciones de hipoxia, entre ellos, HIF se ha identificado como el factor principal que determina la respuesta celular ante la hipoxia. HIF participa en la regulación positiva o negativa de la transcripción de genes involucrados en la glucólisis, la angiogénesis, la vasodilatación así como los procesos que permiten el aumento en la entrega de oxígeno a las células (Fandrey *et al.*, 2006). Aunque la mayor parte de los estudios sobre HIF se han realizado en mamíferos, estos indican que HIF se encuentra distribuido en el reino animal y que su funcionamiento es similar en las diferentes especies de nemátodos (*Caenorhabditis elegans*), artrópodos (*Daphnia magna* y *Drosophila melanogaster*) así como de cordados (*Homo sapiens*) (Fandrey *et al.*, 2006). En crustáceos se conoce la secuencia parcial de aminoácidos de la subunidad HIF- α de *P. vannamei* (no. de acceso GenBank ACG71108) y la secuencia completa de aminoácidos de *Cancer magister* (no. de acceso GenBank ABF83561) y *P. pugio* (no. de acceso GenBank AAT72404).

Se ha sugerido la presencia de un mecanismo celular de detección de oxígeno no relacionado a la cadena transportadora de electrones o a la disminución en concentración de ATP. Este mecanismo de detección de oxígeno está formado por una familia de enzimas que funcionan como hidroxilasas (PHD) (Epstein *et al.*, 2001). Sridharan *et al.*, (2008) propusieron que la ruta metabólica en la que participan las PHD provoca cambios en el metabolismo celular y respuestas compensatorias que dan como resultado un estado protegido de la célula.

2.2.1 Respuestas generadas por condiciones de hipoxia

Como ya se mencionó anteriormente el oxígeno que se toma del ambiente es metabolizado en las mitocondrias, por lo que los cambios en las concentraciones del oxígeno afectan a este organelo y sus funciones. Se sabe que la mitocondria detecta los cambios en la demanda de energía, siendo esta una de las consecuencias de la disminución en las concentraciones de oxígeno (Hochachka, 1996). Se ha encontrado que al igual que lo reportado en los mamíferos, en los crustáceos marinos la capacidad de tolerar condiciones deficientes de oxígeno depende de factores como temperatura, hora del día, así como del estado fisiológico del organismo (Herreid, 1980) y de su genética (Ibarra *et al.*, 2007). Las compensaciones que se generan como repuesta a hipoxia en los crustáceos han sido analizadas fisiológicamente y genéticamente y se ha identificado como principales respuestas, aumento de la captación de oxígeno, disminución de la tasa metabólica, e incremento del metabolismo glucolítico anaerobio (Morris *et al.*, 2004).

En hipoxia los crustáceos responden aumentando la ventilación a través del aumento de la frecuencia de bombeo por parte de los escafnognatitos. A nivel molecular se ha encontrado

que en *P. vannamei* en condiciones de hipoxia ocurren cambios en la concentración de hemocianina así como en la afinidad de la hemocianina por el oxígeno. (Hagerman, 1986). Con respecto a la disminución de la tasa metabólica, cuando la hipoxia se prolonga, se observan movimientos en busca de la superficie y la actividad física disminuye. Ante la hipoxia una de las primeras respuestas es una rápida disminución en la síntesis de proteínas, esta disminución se dice es tan rápida que es difícil poder detectarla con precisión. Siendo este proceso uno de los que más energía consumen en la célula (Blis, 1985). Los seres vivos se desarrollan en ambientes cambiantes, por lo que frecuentemente los organismos muestran capacidad para atenuar los efectos de los cambios en el ambiente a través de ajustes fisiológicos. Esas respuestas adaptativas son evidentes particularmente en especies que se ven expuestas a variaciones en el ambiente como los camarones peneidos (Dall *et al.*, 1990).

2.3 Generalidades de los peneidos

El camarón blanco *P. vannamei* se puede localizar desde las costas de Sonora México hasta Tumbes Perú, tiene preferencias por fondos de sedimento suave y habita desde la línea costera hasta 72 m de profundidad (Martínez-Córdova *et al.*, 2001). Los organismos peneidos se caracterizan por tener rostro bien desarrollado. El cuerpo se divide en tres partes cefalotórax, abdomen y telson. El cefalotórax está cubierto completamente por el caparazón, y está formado por un par de ojos, antenas, anténulas, mandíbulas, maxilas, maxilípedos y pereiópodos, es en esta parte del cuerpo donde se encuentran los sistemas respiratorio, nervioso y digestivo. El abdomen está formado por seis segmentos en donde se

encuentran cinco pleópodos (Figura 3), los urópodos se encuentran en el telson (Dall *et al.*, 1990).

2.4 El Sistema Respiratorio de los peneidos

El proceso descrito como respiración puede dividirse en varios procesos, primero aquel en el que el oxígeno ambiental es transportado del medio ambiente al área de intercambio de gases, seguido del transporte de oxígeno del área de intercambio hacia el interior del organismo a través de las branquias (Figura 3) en el caso de los peneidos, posteriormente se lleva a cabo la perfusión ó remoción del oxígeno del área del intercambio respiratorio, después se realiza el transporte del oxígeno a los tejidos por la hemolinfa, y por último se lleva a cabo la utilización del oxígeno en las mitocondrias de las células. La toma de oxígeno así como la eliminación de dióxido de carbono se lleva a cabo a través de las superficies respiratorias, esto puede ocurrir solo a través de la difusión. Una vez que el oxígeno se encuentra dentro del organismo su transporte se lleva a cabo por la acción de los pigmentos respiratorios en la hemolinfa. Las compensaciones por hipoxia se dan en cada uno de estos niveles de la respiración hasta el nivel molecular (Scholander, 1960). La ventilación en peneidos se lleva a cabo por los escafognatitos, estructuras presentes en la cámara branquial que a través de movimientos oscilatorios realizan el bombeo de agua. El intercambio de gases se da en las branquias, las cuales se encuentran dentro de una cámara branquial entre la pared del cuerpo torácico y la superficie interna del exoesqueleto (Young y Coyer, 1979). Las branquias están formadas por un eje central con una serie de lamelas a lo largo del mismo, cada lamela a su vez está compuesta por filamentos que bifurcan. Las

branquias están cubiertas por una delgada capa de quitina, esta capa es a través de la cual ocurre la difusión de gases.

2.5 El Sistema Circulatorio de los Peneidos

La forma en que es transportado el oxígeno en los peneidos es a través del sistema circulatorio, el cual es llevado desde las branquias hasta los tejidos por medio de la hemolinfa. Este sistema circulatorio (Figura 3) está compuesto por un corazón y arterias que se subdividen en vasos semejantes a capilares. Una vez que se lleva a cabo el intercambio de gases, el oxígeno es transportado por la hemocianina contenida en la hemolinfa, esta última pasa por la punta del filamento dentro del sistema eferente en las branquias y posteriormente llega al corazón, el cual finalmente se encarga de realizar el bombeo que permitirá el transporte de la hemolinfa al resto de los órganos. Se dice que el sistema circulatorio de los peneidos es abierto ya que la hemolinfa al llegar a los tejidos se difunde vía el hemocele o cavidad sanguínea, y así llena los espacios entre tejidos y órganos, para posteriormente ser transportada de nuevo a las branquias (Burger y Smythe, 1953).

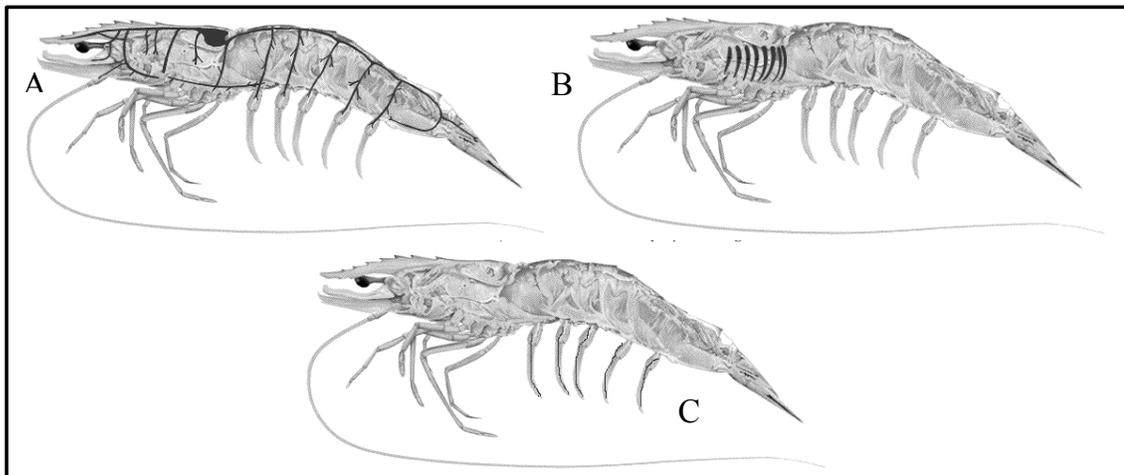


Figura 3. A) Sistema circulatorio, B) branquias y C) pleópodos de organismos del género *Penaeus*, se encuentran resaltadas las partes mencionadas (FAO, 1999).

3. HIPÓTESIS

Si la hipoxia afecta distintos procesos metabólicos de los camarones peneidos, la transcripción de las subunidades $ATP\alpha$ y $ATP\beta$ cambiará en función de los cambios en la síntesis e hidrólisis de ATP que ocurren a condiciones de hipoxia del camarón *P.vannamei*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Caracterizar la secuencia de los transcritos de las subunidades α y β de la F_0F_1 ATP-sintasa de *P. vannamei* y evaluar la concentración de los ARNm de ambas subunidades en tejido de branquias y pleópodos bajo condiciones de hipoxia.

4.2 Objetivos específicos

- Obtener la secuencia de los ARNm de las subunidades α y β del complejo enzimático de la F_0F_1 ATP-sintasa de las branquias de *P. vannamei*.
- Cuantificar la concentración de los ARNm de las subunidades α y β de la F_0F_1 ATP-sintasa en las branquias y los pleópodos de organismos tratados con cinco diferentes concentraciones de oxígeno

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Extracción y cuantificación del ARN total

Para llevar a cabo tanto la secuenciación de los transcritos de las subunidades α y β de la F_0F_1 ATP-sintasa, como para la evaluación de la concentración del ARNm de las dos subunidades en los organismos sometidos a hipoxia, se aisló ARN total, tanto de las branquias, como de los pleópodos de los organismos experimentales (ver sección 5.3).

La extracción del ARN total se basó en el método reportado por Chomczynski y Sacchi (1987), y se usó el reactivo TRIzol[®] (GIBCO, Life Technologies, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Por cada 100 mg de tejido extraído de los organismos (branquias o pleópodos) se agregó 1 mL de TRIzol. Cada muestra de ARN total extraída fue cuantificada por triplicado en un espectrofotómetro Nanodrop[®] ND-1000 (v 3.2, USA), usando una longitud de onda de 260 nm y 280 nm. La pureza de la muestra se determinó a través de la relación de las absorbancias 260/280 nm, aceptando un valor mínimo de 1.7. Además, se verificó la integridad de cada muestra extraída de ARN total por electrofóresis en gel de agarosa al 1% con formaldehído y formamida en condiciones desnaturalizantes y libres de ARNasas, cargando 3 μ g de ARN total por muestra (Sambrook y Russell, 2001).

5.2 Obtención de la secuencia del ADNc de las subunidades α y β

Se referirá a continuación en el texto a las subunidades proteicas del complejo F_0F_1 ATP-sintasa como $ATP\alpha$ y $ATP\beta$ y a los ARNm que codifican para esas subunidades como

ATP α y *ATP β* para distinguir cuando se trate de las secuencias a nivel de aminoácidos o nucleótidos.

A partir de ARN total aislado de las branquias de *P. vannamei* se sintetizó por transcripción reversa ADNc (ADN complementario) usando el Kit comercial de amplificación GeneRacer (Invitrogen). Se siguió la metodología sugerida en el kit (RML-RACE) para amplificar los extremos 5' y 3' del transcrito de ambas subunidades de la F₀F₁ATP-sintasa utilizando los oligonucleótidos de los extremos incluidos en el kit y oligonucleótidos internos específicos para cada subunidad. Para amplificar los extremos de *ATP α* se utilizaron los oligonucleótidos ATPARv1 y GeneRacerTM5'Primer para la obtención del extremo 5' y ATPFw3 y GeneRacerTM3'Primer para la obtención del extremo 3'. Mientras que para el caso de *ATP β* se utilizó el juego de oligonucleótidos, ATPBRv6 y GeneRacerTM5'Primer para el caso del extremo 5', y para el extremo 3' ATPBFw1 y GeneRacerTM3'Primer (Tabla I). Los oligonucleótidos específicos fueron diseñados con base en un alineamiento múltiple realizado con el programa ClustalW, utilizando las secuencias de ESTs (expressed sequence tags) de *P. vannamei* depositadas en el GenBank, para cada una de las subunidades en estudio.

Para cada reacción de amplificación se utilizó 1 μ L de ADNc como templado, un oligonucleótido del extremo 5' o 3' provisto por el kit y un primer interno específico para cada subunidad. También se utilizó la enzima Taq Advantage® 2 Polymerase (Clontech) y los reactivos del kit. La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones, 94°C por 3 min y 30 ciclos de 94°C por 30 s y 68°C por 1 min. Del producto amplificado en la reacción anterior se tomó 1 μ L y se utilizó como templado para una reamplificación en las

mismas condiciones. El producto de PCR logrado se cargó en un gel de agarosa al 1.5 % en buffer TAE 1X, teñido con SYBR Safe (Invitrogen).

Tabla I. Características de los oligonucleótidos específicos utilizados como iniciadores en las reacciones de PCR

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Temperatura de alineación (°C)	Dirección
ATPAFw1	CTCTTCTTTGGCTCGTCACC	62	Sentido
ATPAFw2	ACAACATGGCTCTCGTCTCC	64	Sentido
ATPAFw3	TCAACTTGGAGCCCCGATAAC	63	Sentido
ATPARv1	CCATAGACACGGGCAATACC	62	Antisentido
ATPARv5	GGAGCAGCATCAGAGGCAGTGGCAGAC	78	Antisentido
ATPARv9	TTAGCAATCTACCCTAGCCAC	63	Antisentido
ATPBFw1	GGTGC TGGTGTAGGAAAGAC	62	Sentido
ATPBFw2	GGTGGACGTCCAGTTCCGATG	63	Sentido
ATPBFw5	ATCATGTTGGGAGCTGCACAG	67	Sentido
ATPBRv1	GGCTCATTCACTGACCGTA	62	Antisentido
ATPBRv5	CACCACCGAACAGACCAATC	65	Antisentido
ATPBRv6	ATGCGCCAAGAGTACCAGGACCAACAG	77	Antisentido
L8Fw3	ACTTCCGTGACCCTTATC	62	Sentido
L8Rv3	GTCACCAGTCTTCTCCTC	62	Antisentido

Los productos de PCR obtenidos se insertaron en el vector de clonación del kit comercial TOPO® 4.0 PCR Cloning (Invitrogen), y se obtuvieron clonas con el inserto de interés. Posteriormente se realizó la extracción del ADN plasmídico y los productos se purificaron por columna GFX (General Electric, USA) y fueron enviados a secuenciar (Macrogen Inc., Seúl, Corea). La identidad y similitud de secuencias obtenidas se analizó con los programas en línea BLASTN, BLASTX y BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y se predijo la región del péptido señal (Claros y Vicens 1995).

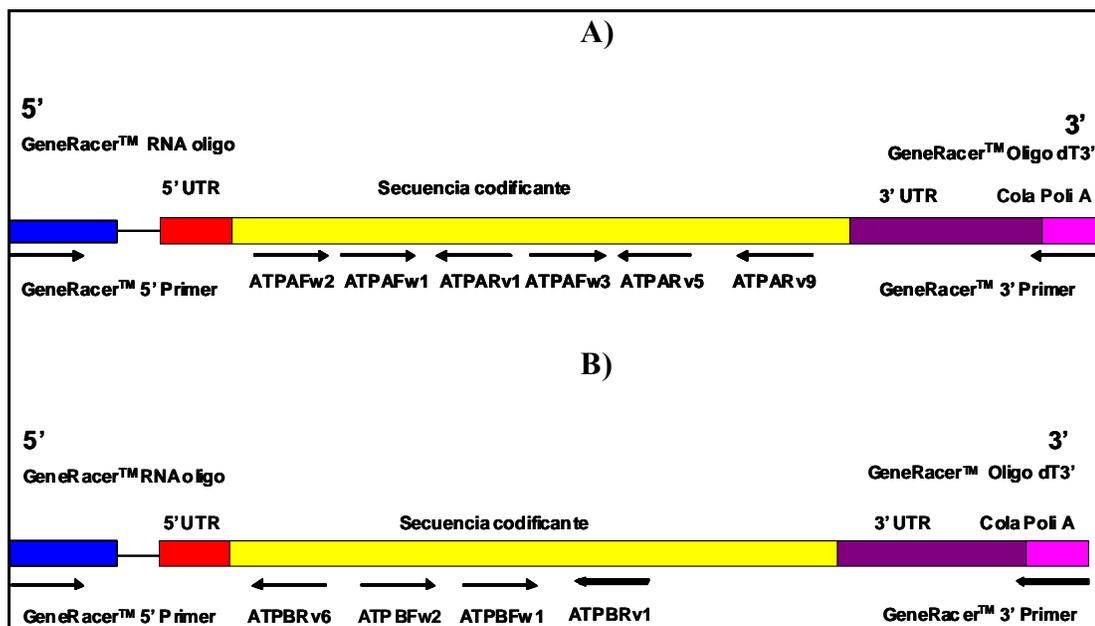


Figura 4. Ubicación de los oligonucleótidos utilizados para la obtención de la secuencia del ADNc de A) *ATPα* y B) *ATPβ* de *P. vannamei*.

5.3 Obtención de tejidos de organismos en condiciones de hipoxia

Se realizó un bioensayo con camarones juveniles de la especie *P. vannamei* con un peso promedio de 30.58 ± 4.31 g en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., situado en La Paz, B.C.S. Los organismos se mantuvieron en condiciones controladas por 8 días (salinidad 35 ‰, temperatura 28 °C y OD en el agua de 6 mg/L), diariamente se les suministró alimento comercial (PIASA, México, con 35% de proteína), se retiró aquel que no fue consumido, así como las heces, y se hizo un recambio diario del 85% del volumen total de agua marina. Los organismos se distribuyeron al azar en 9 tanques con 300 L de agua marina cada uno, todos con una salinidad de 35 ppm, temperatura de 28 °C y una concentración inicial de 6 mg/L (0.19 mM) de OD. Los organismos se sometieron a ayuno por un período de 24 h antes de comenzar el muestreo.

Al momento de iniciar el bioensayo la concentración de OD en los tanques fue de 6 mg/L , en este punto se tomaron las primeras muestras, a continuación se retiraron los aireadores de los tanques y se muestreó el segundo lote cuando la concentración de OD en el agua disminuyó hasta 4 mg/L (0.13 mM), se tomó el tercer lote de muestras cuando la concentración de OD llegó a 2 mg/L (0.06 mM), el cuarto lote cuando la concentración en los tanques fue de 1.5 mg/L (0.05 mM), posteriormente se colocaron de nuevo los aireadores en los tanques y cuando la concentración de OD en el agua llegó a 7 mg/L (0.21 mM) se tomó un lote de estas muestras. Las branquias y los pleópodos fueron disectados de los camarones de forma individual a lo largo del bioensayo en cada una de las diferentes concentraciones de OD antes mencionadas y solo de organismos que se encontraban en intermuda. Se registró el peso de cada organismo muestreado. Las muestras se almacenaron en 250 μ L de TRIzol [®] (GIBCO, Life Technologies, USA) a -80°C hasta antes de ser procesadas.

5.4 Eliminación de ADN genómico

El ARN total de los tejidos muestreados durante el bioensayo se aisló y se confirmó su integridad por electroforesis en condiciones desnaturizantes y cada muestra fue tratada con DNAsa I (Roche, Munich, Alemania) en una razón de 1 U DNAsa/ 1 μ g de ARN total para eliminar el ADN genómico presente en las muestras, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Una vez tratado el ARN total se confirmó la ausencia de ADN genómico con una reacción de PCR incluyendo, como un control positivo para la amplificación de ADN genómico, oligonucleótidos específicos de la subunidad 2 de la citocromo c oxidasa de *P. vannamei* previamente evaluados (no. de acceso GenBank YP_001315034.1).

5.5 Síntesis del ADNc

Se utilizaron 4 μg de ARN total (libre de ADN genómico) tanto de las muestras de branquias como de los pleópodos. La síntesis de ADNc se llevó a cabo con el kit SuperScript III First Strand ADN (Invitrogen Life Technologies, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando como iniciador el oligo dT. Cada muestra sintetizada se probó por PCR convencional antes de ser evaluada por PCR cuantitativa.

5.6 Amplificación de los fragmentos de *ATP α* y *ATP β*

Para amplificar *ATP α* se diseñaron oligonucleótidos específicos para *P.vannamei* con base en la secuencia del EST (no. de acceso GenBank BF024234). Los oligonucleótidos de *ATP β* se diseñaron con base en una secuencia consenso generada a partir del alineamiento de las secuencias del ADNc de *Hemicentrotus pulcherrimus*, *P. monodon* y *Haliotis rufescens*. En el caso del gen de la proteína ribosomal *L8*, fue utilizado como control interno, y se utilizaron oligonucleótidos diseñados de acuerdo a la secuencia de ADNc de *P. vannamei* reportada (no. de acceso GenBank DQ316258).

Se amplificaron fragmentos de los tres genes de interés de *L8* (oligonucleótidos L8Fw3 y L8Rv3), *ATP α* (oligonucleótidos ATPAFw1 y ATPARv1) y *ATP β* (oligonucleótidos ATPBFw1 y ATPBRv1) por PCR convencional, utilizando como templado 250 ng de ADNc de los dos tejidos estudiados. Para cada reacción se usó una mezcla Super Mix Platinum® (Invitrogen) con MgCl_2 , solución amortiguadora para la enzima, Taq polimerasa, y los oligonucleótidos sentido y antisentido (20 μM) necesarios para cada

reacción. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes, 95 °C por 5 min y 40 ciclos de 95 °C por 1 min, 62 °C por 1min, 72 °C por 1min, y una extensión final a 72 °C por 10 min. El tamaño de las bandas resultantes de la amplificación por PCR fue verificado a través de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% usando SYBR Safe® (Molecular Probes, USA). El análisis de los geles se llevó a cabo en un fotodocumentador de luz UV Gel Logic 200 Imaging System, a través del programa Molecular Imaging System V 4.0.2 (Kodak, USA).

5.7 Cuantificación del ARNm de *ATP α* y *ATP β* por PCR cuantitativo

Para la evaluación de las concentraciones de ARNm de cada gen *ATP α* , *ATP β* y *L8* en las muestras de las branquias y los pleópodos obtenidos durante el bioensayo, se utilizó un equipo IQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (BioRad, USA) el cual se basa en la detección y cuantificación de fluorescencia. En el ensayo se utilizó el fluoróforo SYBR-Green que intercalado en las dobles cadenas de los productos de PCR emite a 590 nm. A cada reacción se le agregaron 250 ng de ADNc, 12.5 μ L de mezcla 2X iQ SYBR® Green Supermix (BioRad) (KCl 100 mM, Tris-HCl 40 mM a pH 8.4, mezcla de dNTPs 1.6 mM, iTaq ADN polimerasa 50 U/mL, MgCl₂ 6 mM, SYBR- Green I, fluoresceína 20nM), 1 μ L de cada uno de los oligonucleótidos 20 μ M, y 9.5 μ L de agua estéril para reacciones con un volumen final de 25 μ L. Cada muestra fue amplificada por duplicado. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes 95 °C por 5 min, 40 ciclos de 95 °C por 30 s, 62 °C por 35 s, 68 °C por 55 s y un programa final para la evaluación de una curva de disociación que incluye la detección de la fluorescencia desde una temperatura de 95 hasta 60 °C disminuyendo 0.3 °C cada 20 s.

Se construyó una curva estándar para la cuantificación del ARNm de cada uno de los genes de interés utilizando los productos de PCR específicos purificados a través de una columna GFX (General Electric, USA) y cuantificados. A partir de cada uno se prepararon diluciones seriadas 1:10, desde una concentración de $0.25 \text{ ng}/\mu\text{L}$ hasta $2.5 \text{ ng}/\mu\text{L} \times 10^{-9}$, con agua estéril. En el caso de las reacciones utilizadas para construir las curvas estándar, se agregó $1 \mu\text{L}$ de templado. Para cada uno de los genes evaluados se incluyeron controles negativos sin templado y sin oligonucleótidos. Para realizar el análisis de la concentración de los transcritos se utilizó el método $ER=2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

5.8 Análisis estadístico

Se determinó la normalidad de los datos por medio de la prueba de Kolmogorov-Smirnov. También se utilizó la prueba de Bartlett para determinar la homocedasticidad de los datos. Posteriormente se determinaron diferencias entre los tratamientos aplicando la prueba de Kruskal Wallis seguida por la de Mann Whitney utilizando el paquete estadístico Statistica 6.

6. RESULTADOS

6.1 Secuencia del ADNc de *ATPα* de *P. vannamei*

Se obtuvo una secuencia de 1,653 pb del camarón blanco *P. vannamei* la cual se identificó como el transcrito de *ATPα* con base a los distintos análisis bioinformáticos realizados. La secuencia obtenida resultó ser similar al ADNc de *ATPα* de la F₀F₁ATP-sintasa de otras especies, 83% al salmón del Atlántico *Salmo salar* (no. de acceso en GenBank NM_001139660) y 82% al ADNc de la mosca de la fruta *D.melanogaster* (no. de acceso en GenBank Y07894). La secuencia contiene el codón de inicio ATG y el codón de término (Figura 5).

```

1  M A L V S A R L A S S L A R H L P R A T
1  ATGGCTCTCGTCTCCGACGTCTTGCCCTTCTTTGGCTCGTCCACCTCCCAGGGCGACT
21  P Q V A K V L P A A A I V S R K F T T S
61  CCCCAGGTGCGAAAGGTCCTCCCAGCTGCGGCCATTGTGTCCCAGGTTCCACCACCAGC
41  N V V S S A E V S T I L E E R I L G A A
121 AATGTGGTGTCTCGGCCGAAGTGTCCACCATCCTTGAGGAGCGCATCCTGGGTGCTGCC
61  P K S N L E E T G R V L S I G D G I A R
181 CCAAGTCCAACCTGGAAGAGACAGGACGTGTGCTGAGCATTGGTGACGGTATTGCCCGT
81  V Y G L K N I Q A E E M V E F S S G L K
241 GTCTATGGCTTGAAGAACATCCAGGCTGAGGAGATGGTGGAGTTCCTCTGGACTTAAG
101 G M A L N L E P D N V G V V V F G N D K
301 GGTATGGCCCTCAACTTGGAGCCCCGATAACGTTGGTGTGTGCTGTTGCGNADGACAAG
121 L I R E G D I V K R T G A I V D V P V G
361 CTTATCCGTGAGGGTGATATCGTGAAGCGTACTGGAGCCATTGTGGACGTGCCTGTTGGT
141 E A I L G R V V D A L G N P I D G K G P
421 GAGGCCATCCTGGGCCGTGTTGTGGATGCTCTGGGTAACCCCATGACGGCAAGGGTCTCT
161 I T G G L R A R V G V K A P G I I P R I
481 ATCACTGGTGGCCTGAGGGCTCGTGTGGGTGTGAAGGCCCTGGTATCATCCCTCGTATC
181 S V R E P M Q T G I K A V D S L V P I G
541 TCTGTGAGGGAGCCCATGCAGACTGGCATCAAGGCCGTAGACTCTCTGTGCCTATTGGT
201 R G Q R E L I I G D R Q T G K T A I A I
601 CGTGGCCAGCGAGAGTTGATCATTGGTGATCGTCAGACTGGCAAGACTGCCATTGCCATC
221 D T I I N Q K R F N D A A E E K K K L Y
661 GACACCATCATCAACCAGAAGCGATTCAACGATGCTGCTGAGGAAAAGAAGAACTGTAC
241 C I Y V A I G Q K R S T V A Q I V K R L
721 TGTATCTACGTTGCTATTGGCCAGAAGAGGTCCACTGTGGCCAGATTGTGAAGAGGCTC
261 T D A D A M K Y T I V V S A T A S D A A
781 ACTGATGCTGATGCCATGAAGTACACCATTGTGGTGTCTGCCACTGCCTCTGATGCTGCT
281 P L Q Y L A P Y S G C A M G E F F R D N
841 CCTCTGCAGTATTTGGCCCCCTACTCTGGCTGTGCCATGGGAGAATTCTTCCGTGACAAT
301 G K H A L I I Y D D L S K Q A V A Y R Q
901 GGCAAGCACGCCCTGATCATCTATGACGATCTGTCCAAGCAGGCTGTGGCCTACCGTCAG
321 M S L L L R R P P G R E A Y P G D V F Y

```

```

961 ATGTCCCTGCTGCTGCGTCGTCCTCCCGGTCGTGAGGCCTACCCTGGTGATGTGTTCTAC
341 L H S R L L E R A A K M N D T N G G G S
1021 CTTCACTCCCGTCTCCTTGAGCGTGCTGCCAAGATGAACGACACCAATGGAGGTGGCTCT
361 L T A L P V I E T Q A G D V S A Y I P T
1081 CTCACTGCCCTGCCCGTCATCGAGACCCAGGCTGGTGATGTGTCTGCCTACATTCCCTACT
381 N V I S I T D G Q I F L E T E L F Y K G
1141 AACGTGATTTCCATCACTGACGGACAGATCTTCTTGGAGACTGAGCTCTTCTACAAGGGT
401 I R P A I N V G L S V S R V G S A A Q T
1201 ATTCGTCTGCCATCAACGTCCGGTCTGTCTGTATCCCGTGTAGGATCCGCTGCCCAGACT
421 K A M K Q V A G S M K L E L A Q Y R E A
1261 AAGCCATGAAGCAGGTTGCAGGTTCCATGAAGCTGGAATTGGCCCAGTACCGTGAGGCC
441 A A F A Q F G S D L D A S T Q Q L L N R
1321 GCTGCTTTTGCCAGTTCGGTTCTGACTTGGATGCTTCCACCCAACAGCTGCTTAACCGT
461 G V R L T E L L K Q G Q Y V P M A I E E
1381 GGTGTTCGTCTTACTGAGCTCTTGAAGCAGGGACAGTATGTGCCCATGGCCATTGAGGAA
481 Q V A V I Y C G V C G H L D K M D P S K
1441 CAGGTTGCCGTCACTACTGCGGTGTGTGTGGCCACTTGGACAAGATGGACCCCTCCAAG
501 I T K F E Q E F M A M L K T S H Q G L L
1501 ATCACCAAGTTCGAGCAGGAGTTTCATGGCCATGCTGAAGACCAGCCACCAGGACTCCCTT
521 D N I A K E G H I T P E S D A K L K Q I
1561 GACAACATTGCCAAGGAGGGACACATCACCCAGAGAGCGATGCCAAGCTGAAGCAGATC
541 V T D F L A T F Q A *
1621 GTCACAGACTTCTGGCCACCTTCCAGGCCTAA

```

Figura 5. Secuencia parcial del ADNc de *ATP α* y la secuencia deducida de aminoácidos del camarón blanco *P. vannamei*. En un cuadro, los codones de inicio y término. La secuencia subrayada indica al péptido señal.

La secuencia deducida de aminoácidos a partir del ADNc de *ATP α* consta de 550 aminoácidos, al compararla con la secuencia de aminoácidos de *ATP α* de otros organismos se encontró que es 87% idéntica a dicha proteína del gusano de la seda *Bombix mori* (no. de acceso en GenBank NP_001040233), 84% a la del mosquito *Aedes aegypti*, además presentó identidad con *ATP α* de algunas especies de vertebrados (Figura 6). Se identificó teóricamente a través del programa Mitoprot (Claros y Vicens, 1995) el péptido señal, el cual está formado por los primeros 45 aminoácidos, entre estos se encuentran 6 aminoácidos con carga positiva y ninguno con carga negativa, esta preproteína tiene una masa molecular de 59.23 kDa. Tomando en cuenta lo anterior la proteína madura está compuesta de 505 aminoácidos, con masa molecular de 54.66 kDa y un punto isoelectrónico teórico de 7.59. Al realizar una búsqueda de las secuencias conservadas en la base de datos

del National Center for Biotechnology Information (NCBI por sus siglas) se encontró que la secuencia de ATP α de *P. vannamei* contiene las secuencias conocidas como Walker A y Walker B, las cuales se encuentran conservadas en enzimas en las que ATP ó ADP participan en la catálisis, enzimas como la miosina, la fosfofructocinasa y la adenilato quinasa, entre otras (Walker *et al.*, 1982). Además se identificaron los dominios ATP-synt_ab_N comprendido desde el aminoácido 64 al 132, ATP-synt_ab desde el aminoácido 188 al 412 y ATP-synt_ab_C del aminoácido 424 al 528.

Al analizar la comparación múltiple de secuencias de aminoácidos de ATP α de distintos organismos (Figura 6), se identificaron aminoácidos diferentes en el camarón *P. vannamei* en comparación al resto de las secuencias, K \rightarrow R123 (a excepción de *E. coli* que tiene A en esa posición) es una sustitución conservativa que se encuentra en el dominio ATP-synt_ab_N. Además se identificaron aminoácidos conservados entre *P. vannamei* y *D. melanogaster* pero que difieren con el aminoácido conservado en el resto de los organismos con los que se realizó la comparación de las secuencias, estas sustituciones se encontraron en el dominio ATP-synt_ab_C, A \rightarrow C487 es una sustitución semiconservativa ya que son distintos con respecto a la hidrofobicidad pero similares en tamaño, y R \rightarrow A524 sustitución no conservativa en relación al tamaño (a excepción de *E. coli* que presenta N en esa posición). Se encontró un aminoácido conservado en el resto de los organismos pero en los cuales las secuencias de *P. vannamei* y *D. melanogaster* difieren, el primer organismo presenta S \rightarrow T50 es una sustitución conservativa y *D. melanogaster* presenta la sustitución también conservativa N \rightarrow T.

Pv MALVSARLASSLARHLPRATPQVAK--VLPAAAVSRKFTTSN----VVSSAEVSTILEE 54
Dm MSIFSARLASSVARNLPKAAANQVACKAAYPAASLAARKLHVAS----TQSAEISNILEE 56
Xl --MLSVRVAALRALPRQSGLVSKK-ALGAAFVATRNIHASGAWLQKSGTAEVSSILEE 57
Gg --MLSVRVAAVFARSLPRQAGLVS RN-ALGAAFVATRNIHASKMRFQKTGTAEVSSILEE 57
Hs --MLSVRVAAVR RALPRRAGLVS RN-ALGSSFIAARNFHASNTHLQKTGTAEVSSILEE 57
Bt --MLSVRVAAVARALPRRAGLVSKN-ALGSSFIAARNLHASNSRLQKTGTAEVSSILEE 57
Cc --MLSGRVAAALARTLPRRAGFVSKN-VAAAACVGAKNLHTARPWLQKTGTAEVSSILEE 57
Pf --MLSARLAASLVRQLPRAAPKVQCH-ALGAGLISAKKFSTSTHHHTAGASAEVSSILEE 57
Sp MAQVSVRLAAAAARSLSRQAPQVAKR-CIGAAVYSHRNVTTSSAP---RPSTAEVSSILEE 56
Sc ---MLAR--TAAIRSLSRTLINSTKAARPAALASTRRLAST---KAQPTVEVSSILEE 51
Ec -----MQLNSTEISELIKQ 14

.*:* : : :

ATP-synt_ab_N

Pv RILGAAPKSNLEETGRVLSIGDGIARVYGLKNIQAEEMVEFSSGLKGMALNLEPDNVGVV 114
Dm RILGVAPKADLEETGRVLSIGDGIARVYGLNNIQADEMVEFSSGLKGMALNLEPDNVGVV 116
Xl RILGADISTDLEETGRVLSIGDGIARVYGLRNVQAEEMVEFSSGLKGMALNLEPDNVGVV 117
Gg RILGADTSAELEETGRVLSIGDGIARVYGLRNVQAEEMVEFFGLKGMALNLEPDNVGVV 117
Hs RILGADTSVDLEETGRVLSIGDGIARVHGLRNVQAEEMVEFSSGLKGMALNLEPDNVGVV 117
Bt RILGADTSVDLEETGRVLSIGDGIARVHGLRNVQAEEMVEFSSGLKGMALNLEPDNVGVV 117
Cc KILGADTSAALEETGRVLSIGDGIARVYGLRNVQAEEMVEFSSGLKGMALNLEPDNVGVV 117
Pf RILGQTTQAGLEETGRVLSIGDGIARVYGLKNIQAEEMVEFSSGLKGMALNLEPDNVGVV 117
Sp RILGHTPKENLEETGRVLSIGDGIARVYGLKNIQAEEMVEFSSGLKGMALNLEPDNVGVV 116
Sc RIKGVSDEANLNETGRVLAVGDGIARVFGLNNIQAEELVEFSSGVKGMALNLEPDNVGVV 111
Ec RIAQFNVVSEAHNEGTIVSVSDGVIIRIHGLADCMQEMISLPGNRYAIALNLERDSVGAV 74
:* : * : : : : . * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *

Pv VFGNDKLIKEGDIKRTGAIIVDVPVGEAILGRVVDALGNPIDGKGPITGGLRARVGVKAP 174
Dm VFGNDKLIKQGDIVKRTGAIIVDVPVGEELLGRVVDALGNAIDGKGAINTKDRFRVGIKAP 176
Xl VFGNDKLIKEGDIKRTGAIIVDVPVGEELLGRVVDALGNAIDGKGPLTSKIRRRVGLKAP 177
Gg VFGNDRLIKEGDVVKRTGAIIVDVPVGEELLGRVVDALGNPIDGKGPITSKTRRRVGLKAP 177
Hs VFGNDKLIKEGDIKRTGAIIVDVPVGEELLGRVVDALGNAIDGKGPISKTRRRVGLKAP 177
Bt VFGNDKLIKEGDIKRTGAIIVDVPVGEELLGRVVDALGNAIDGKGPISKARRRVGLKAP 177
Cc VFGNDKLIKEGDIKRTGAIIVDVPVGEELLGRVVDALGNAIDGKGPLGSKQRRRVGLKAP 177
Pf VFGNDKLIKEGDIKRTGAIIVDVPVGEELLGRVVDALGNPIDGKGPITSPDRQVRVGVKAP 177
Sp VFGNDKLIKEGDVVKRSGAIIVDVPVGESILGRVVDALGTPIDGKGPLGTEHRARVGTAP 176
Sc LFGSDRLVKEGELVKRTGNIVDVPVGPGLLGRVVDALGNPIDGKGPIDAAGRSRAQVKAP 171
Ec VMGPYADLAEGMKVKCTGRILEVVPVGRGLLGRVVNTLGAPIDGKGPLDHDGDFSAVEAIAP 134
:* : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *

ATP-synt_ab Walker A

Pv GIIPRISVREPMQTGIKAVDSLVP IGRGQRELIIGDRQTGKTAIAIDTIIINQKRFNDAAE 234
Dm GIIPRVSVREPMQTGIKAVDSLVP IGRGQRELIIGDRQTGKTALAIIDTIIINQKRFNEAQD 236
Xl GIIPRISVREPMQTGIKAVDSLVSIGRGQRELIIGDRQTGKTSIAIDTIIINQKRFNEGTD 237
Gg GIIPRISVREPMQTGIKAVDSLVP IGRGQRELIIGDRQTGKTSIAIDTIIINQKRFNDGTD 237
Hs GIIPRISVREPMQTGIKAVDSLVP IGRGQRELIIGDRQTGKTSIAIDTIIINQKRFNDGSD 237
Bt GIIPRISVREPMQTGIKAVDSLVP IGRGQRELIIGDRQTGKTSIAIDTIIINQKRFNDGTD 237
Cc GIIPRISVREPMQTGIKAVDSLVP IGRGQRELIIGDRQTGKTAIAIDTIIINQKRFNDGTE 237
Pf GIIPRISVKEPMQTGIKTVDSLVP IGRGQRELIIGDRQTGKTAIAIDTIIINQKRFNDGTN 237
Sp G-IPRISVREPMQTGIKAVDSLVLICRGQRELIIGDRQTGKTAVAIIDTIIINQKRFNDEAE 235
Sc GILPRRSVHEPVQTGLKAVDALVP IGRGQRELIIGDRQTGKTAVALDITILNQRWNNGSD 231
Ec GVIERQSVDPVQTYGKAVDSMIP IGRGQRELIIGDRQTGKTALAIIDAIINQR----- 187
* : * * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *

Pv EKKKLYCIYVAIGQKRSTVAQIVKRLTDADAMKYTIVVSATASDAAPLOYLAPYSGCAMG 294
Dm ESKKLYCIYVAIGQKRSTVAQIVKRLTD SGAMGYSVIVSATASDAAPLOYLAPYSGCAMG 296
Xl EKKKLYCIYVAIGQKRSTVAQLVKRLTDADAMKYTIVVSATASDAAPLOYLAPYSGCSMG 297
Gg EKKKLYCIYVAIGQKRSTVAQLVKRLTDADAMKYTIVVSATASDAAPLOYLAPYSGCSMG 297
Hs EKKKLYCIYVAIGQKRSTVAQLVKRLTDADAMKYTIVVSATASDAAPLOYLAPYSGCSMG 297

Pv	<u>AK</u> EGHITPESDAKLKQIVTDFLATFQA	550
Dm	<u>AK</u> DGAISEASDAKLKDIVAKFMSTFQG	552
Xl	RTDGKISEQADAKLKEIVLNFLSTFEA	553
Gg	RTEGKISDQTEAKLKEIFTNFLSTFEA	553
Hs	RADGKISEQSDAKLKEIVTNFLAGFEA	553
Bt	RTDGKISEESDAKLKEIVTNFLAGFEA	553
Cc	RTDGKISEASDAKLKEVVLNFLASFE-	552
Pf	RKDGQITEASDAKLKEVVTQFLSTFEA	553
Sp	RTEGQLSPQTEATLKDVLKFLDTFEG	551
Sc	REKGELSKELLASLKSATESFVATF--	545
Ec	NQTGGYNDEIEGKLGILDSFKATQSW	513
	* . . . ** . *	

Figura 6. Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia del ADNc de *ATP α* de *P. vannamei* con la secuencia de aminoácidos de *ATP α* de de otros organismos. Los signos debajo de las secuencias indican aminoácidos iguales (*), sustituciones conservativas (:), y sustituciones semiconservativas (.). Se resalta en gris en la secuencia de *P. vannamei* las secuencias conservadas identificadas, los dominios están subrayados. Las columnas de aminoácidos resaltadas indican las sustituciones. Pv (*P. vannamei*), Dm (*D. melanogaster*), Xl (*X. laevis*), Gg (*Gallus gallus*), Hs (*H. sapiens*), Bt (*B. taurus*), Cc (*C. carpio*), Pc (*P. fucata*), Sp (*Strongylocentrotus purpuratus*), Sc (*S. cerevisiae*), Ec (*E. coli*).

6.2 Secuencia del ADNc de *ATP β* de *P. vannamei*

Se obtuvo una secuencia de ADNc que corresponde a *ATP β* de la F₀F₁ATP-sintasa de *P. vannamei*. Es 82% similar al ADNc de *ATP β* de la F₀F₁ATP-sintasa del langostino *P. leniusculus* (no. de acceso en GenBank DQ874396), 81% similar a la secuencia de *C. carpio* (no. de acceso en GenBank AB023582) y *S. salar* (no. de acceso en GenBank BT043960). La secuencia está compuesta de 1,823 nucleótidos y contiene el codón de inicio ATG, el codón de término, la señal de poliadenilación, y la cola poli A en el extremo 3' del ADNc, además 3 nucleótidos que forman parte de la región no traducible (UTR por sus siglas en inglés “untranslated region”) del extremo 5' y 245 nucleótidos que forman la región UTR del extremo 3 (Figura 7).

1 M L G A A Q R A C S T I L K A A K P A
 1 ATCATGTTGGGAGCTGCACAGCGCGCTTGCTCCACCATCTAAAGGCAGCGAAGCCTGCT
 20 V V S K G L Q N V G S K T L P A L Y T C
 61 GTCGTCTCCAAGGGCCTGCAAATGTAGGCTCCAAGACTCTTCCAGCGCTCTACACCTGC
 40 Q R N Y A A K A E A A T Q T G V A N G S
 121 CAGCGCAACTATGCTGCCAAGGCTGAGGCTGCCACCCAGACTGGTGTGGCCAATGGCAGT
 60 V V A V I G A V V D V Q F D G E L P P I
 181 GTAGTAGCTGTCAATTGGTGTGTGGTGGACGTCCAGTTCGATGGAGAGCTCCCCCTATT
 80 L N A L E V A N R S P R L V L E V A Q H
 241 CTC AATGCTCTTGAGGTTGCCAACCGCTCCCCAAGGCTGGTGTGAGGTTGCTCAGCAT
 100 L G E N T V R T I A M D G T E G L I R G
 301 CTTGGTGAGAACACTGTCCGACCATTGTCTATGGATGGTACTGAGGTCTCATCCGTGGT
 120 N A V V D T G S P I S I P V G P G T L G
 361 AATGCTGTCGTTGATACTGGAAGCCCCATCTCCATCCCTGTTGGTCTGGTACTCTTGGC
 140 R I I N V I G E P I D E R G P I P T E H
 421 CGCATTATCAATGTGATTGGTGAGCCCATTGATGAACGTGGCCCCATTCCCCTGAACAC
 160 F S A I H A E A P D F V E M S V E Q E I
 481 TTCTCTGCTATTCATGCTGAGGCTCCCGACTTCGTTGAGATGTCTGAGCAGGAGATT
 180 L V T G I K V V D L L A P Y S K G G K I
 541 CTCGTAAGTGGCATCAAGGTGGTTCGACCTCTTGGCCCCATACTCCAAGGGAGGAAAGATT
 200 G L F G G A G V G K T V L I M E L I N N
 601 GGTCTGTTCGGTGGTGTGGTGTAGGAAAGACTGTACTTATCATGGAAGTGAATTAACAAC
 220 V A K A H G G Y S V F A G V G E R T R E
 661 GTTGCCAAGGCTCACGGTGGTTACTCAGTATTTGCTGGTGTGGGAGAGCGCACCCGTGAG
 240 G N D L Y H E M I E S G V I S L K D D T
 721 GGTAACGATCTGTACCACGAGATGATTGAGTCTGGTGTCTCTCTGAAGGATGATACC
 260 S K V S L V Y G Q M N E P P G A R A R V
 781 TCCAAGGTATCTCTCGTGTACGGTTCAGATGAACGAGCCCCAGGTGCCCGTGCCCGTGT
 280 A L T G L T V A E Y F R D Q E G Q D V L
 841 GCCCTGACTGGTCTGACTGTGGCCGAGTACTTCCGTGATCAGGAAGGTCAAGATGTGCTG
 300 L F I D N I F R F T Q A G S E V S A L L
 901 CTCTTCAATTGACAACATTTCCGCTTACACAAGCTGGTTCGAGGTGTCTGCCCTGCTG
 320 G R I P S A V G Y Q P T L A T D M G S M
 961 GGTCTATCCCATCTGCTGTAGGTTACCAGCCTACTCTGGCCACTGACATGGGTAGCATG
 340 Q E R I T T T K K G S I T S V Q A I Y V
 1021 CAGGAAAGAATTACTACCACCAAGAAGGGATCAATTACCTCTGTGACGGCCATCTATGTA
 360 P A D D L T D P A P A T T F A H L D A T
 1081 CCTGCTGATGACTTGACTGATCCTGCCAGCCACCCTTCGCTCACTTGGACGCTACT
 380 T V L S R G I A E L G I Y P A V D P L D
 1141 ACTGTGTGTCTCGTGGTATTGCCGAGTTGGGTATTTACCCTGCTGTGGATCCTCTCGAT
 400 S I S R I M D A N I I G H E H Y N V A R
 1201 TCCATCTCCCGTATCATGGACGCCAACATCATCGGACCGAACATTACAATGTTGCCCGT
 420 S V Q K I L Q D H K S L Q D I I A I L G
 1261 AGTGTGCAGAAGATTCTCAGGATCATAAGTCGCTCCAGGATATTATGCTATCTTGGGT
 440 M D E L S E E D K L T V A R A R K I Q K
 1321 ATGGATGAATTGTCTGAGGAGGACAAGCTCACAGTCGCCCGTGCACGTAAGATCCAGAAG
 460 F L S Q P F Q V A E V F T G Y S G K F V
 1381 TTCCTGTACAGCCTTCCAAGTGGCTGAGGTGTTTACTGGCTACTCTGGAAAGTTCGTT
 480 S L P D P I R S F K E I L A G K Y D D L
 1441 TCCCTGCCTGATCCCATCAGGAGCTTCAAGGAAATCTGGCTGGCAAGTACGATGACCTC
 500 P E A P F Y M Q G S I E D V I E K A E Q
 1501 CCTGAAGCTCCCTTCTACATGCAAGGAAGTATTGAGGATGTCATTGAAAAGGCAGAACAG
 520 L A A Q P S *
 1561 TTGGCTGCCAGCCAGCCAGCTAAGGAGGAAATATAATTGTGGGGTATTTTAAATGTGTACA
 1621 GGGCTCTGGAAAGAAATATCCATGTTCTCTTTGTTGCAAAGTAAGGGCCAAGTGGTCTGTG
 1681 TTCTTAGACTATGGCAAACATATTTTTAGGGGTACTCCGAGAATCTGGAGTAACTTCTG
 1741 TTGTACAGAATTCCAGTGATAATGTAAATTTATAATAATATCCAGAAACCCAAAAAAA

1801 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura 7. Secuencia del ADNc de *ATPβ* y la secuencia deducida de aminoácidos del camarón blanco *P. vannamei*. En un cuadro, los codones de inicio y término. La secuencia subrayada indica el péptido señal. La señal de poliadenilación se resalta con doble raya y la cola poli se resalta al final de la secuencia.

A partir del ADNc se dedujo la secuencia de aminoácidos, misma que a través de un alineamiento múltiple (Figura 8) se comparó con *ATPβ* de otros organismos y se encontró que tiene una identidad del 91% con la del langostino *P. leniusculus* (no. de acceso en GenBank ABI34071). *ATPβ* contiene 525 aminoácidos y una masa molecular que se estima en 55.96 kDa. Se identificó en la secuencia del péptido señal de 44 aminoácidos, entre ellos 7 con carga positiva y 1 con carga negativa. La proteína madura está formada por 481 aminoácidos, cuya masa molecular y punto isoelectrico son de 51.45 kDa y 4.78 respectivamente. Al realizar un análisis de secuencias conservadas en la base de datos del NCBI se encontró que la secuencia deducida de aminoácidos de *ATPβ* del camarón contiene las secuencias denominadas Walker A y Walker B, DELSEED, GERXXE, así como los dominios ATP-synt_ab_N comprendido del aminoácido 60 al 126, ATP-synt_ab desde el aminoácido 182 al 401 y ATP-synt_ab_C del aminoácido 414 al 521.

Al analizar la comparación múltiple que se realizó con la secuencia de *ATPβ* de *P. vannamei* y la de otros organismos (Figura 8), se encontró que la secuencia deducida de *P. vannamei* presenta diferencias en posiciones que se encuentran conservadas en el resto de los organismos que se incluyen en la comparación. La sustitución K6R→S59 se encuentra en el extremo amino en *P. vannamei*, esta sustitución es semiconservativa ya que se trata de un aminoácido sin carga y de un tamaño menor al aminoácido que presentan los demás

organismos, V→I117 es conservativa y se encuentra en el dominio ATP-synt_ab_N, la sustitución T→P484 es semiconservativa y se encuentra en el dominio ATP-synt_ab_C.

También se identificaron sustituciones que fueron específicas para los decápodos *P. vannamei* y *P. leniusculus*, A→S194 (a excepción de *S. cerevisiae* que tiene K) es una sustitución conservativa ya que ambos aminoácidos son similares en tamaño, esta sustitución se encuentra 10 aminoácidos hacia el extremo amino con respecto la secuencia Walker A en el dominio ATP-synt_ab, T→I401 (a excepción de *S. cerevisiae*) el aminoácido de *P. vannamei* es hidrofóbico a diferencia de T. Y→H428 (a excepción de *P. fucata* que presenta F) es una sustitución conservativa en relación al tamaño, A→P503 sustitución semiconservativa y se encuentra en el dominio ATP-synt_C. Además se identificaron aminoácidos conservados en el resto de los organismos y diferentes entre *P. vannamei* y *P. leniusculus*, V→Q507 en *P. vannamei* y V→R507 en *P. leniusculus*, sustituciones semiconservativa, además V→I514 en *P. vannamei* y V→L514 en *P. leniusculus* las cuales son sustituciones semiconservativas.

```

Pv      MLGAAQRACST----ILKAAKPAVVSQGLQNVGSKTLPALYTCQRNYAAKAEAAATQTGVA 56
Pl      MLGAAARACSS----VLKAAKPAVASLSLQNGGARTVPAVYTAHRNYAAKAEAAATQTGVA 56
Cc      MLGAVGRCTG----ALQALRPGVTPLK-----LNGAPAALFSRRDYVAPAAAAA---A 49
Xl      MLGAVGRCSAG----ALRALKPTSSPVQLGQNLRLRYSPAALHSRRDYAAQTSAAAKPGTA 56
Bt      MLGLVGRVVAASASGALRGLSP-SAPLPQAQLLLRAAPAALQPARDYAAQASPSPKAGAT 59
Hs      MLGFVGRVAAAAPASGALRRLTP-SASLPPAQLLLRAVRRRFHPVRDYAAQTSPPKAGAA 59
Dm      MF-----ALRAASKADKNLLP-----FLGQLSRSHAAKAAKAAA--AA 36
Pf      MMHAVRRACAG----VFKTSNSFIGTTSNTCSHAKVIPSYLSTRRHAAEPKAAAAT--T 54
Sc      -----MVLPRLYTATSRAAFKAAKQSAPLLSTSWKRCMASAAQSTP---I 42
Ec      -----MA 2

```

ATP-synt_ab_N

```

Pv      NGSVVAVIGAVVDVQFDGE-LPPILNALEVANRSPRLVLEVAOHLGENTVRTIAMDGTEG 115
Pl      TGKVAVIGAVVDVQFEGE-LPPILNSLEVENRTPRLVLEVAQHLGENTVRTIAMDGTEG 115
Cc      SGRIVAVIGAVVDVQFDED-LPPILNALEVAGRDRTRLVLEVAQHLGENTVRTIAMDGTEG 108
Xl      SGRIVAVIGAVVDVQFDED-LPPILNALEVQGRDRTRLVLEVAQHLGENTVRTIAMDGTEG 115
Bt      TGRIVAVIGAVVDVQFDEG-LPPILNALEVQGRETRLVLEVAQHLGESTVRTIAMDGTEG 118
Hs      TGRIVAVIGAVVDVQFDEG-LPPILNALEVQGRETRLVLEVAQHLGESTVRTIAMDGTEG 118
Dm      NGKIVAVIGAVVDVQFDDN-LPPILNALEVDNRSPRLVLEVAQHLGENTVRTIAMDGTEG 95
Pf      PGKVVSVIGAVVDVQFEDS-LPPILNALEVKNRKPRLILEVAQHLGENTVRTIAMDGTEG 113
Sc      TGKVTAVIGAIVDVHFEQSELPAILNALEIKTPQGKLVLEVAQHLGENTVRTIAMDGTEG 102

```

Ec TGKIVQVIGAVVDVEFPQDAVPRVYDALEVQNGNERLVLEVQQQLGGGIVRTIAMGSSDG 62
 * : . ***** : * : *

Pv LVRGNAVVDTGSPISIPVPGTGLGRIINVIGEPIDERGPIPTHEFSAIHAEAPDFVEMSV 175
 Pl LVRGNAVVDTGSPISIPVPGTGLGRIINVIGEPIDERGPVPTFEFYSAIHAEAPDFVEMSV 175
 Cc LVRGQKVLDTGAPIRIPVGPETLGRIMNVIGEPIDERGPITTKQTAPIHAEAPEFTDMSV 168
 Xl LVRGQKVLDTGAPIRIPVGPETLGRIMNVIGEPIDERGPITTKQFAAIHAEAPEFVEMSV 175
 Bt LVRGQKVLDSGAPIRIPVGPETLGRIMNVIGEPIDERGPIKTKQFAAIHAEAPEFVEMSV 178
 Hs LVRGQKVLDSGDQLKIPVGPETLGRIMNVIGEPIDERGPIKTKQFAAIHAEAPEFVEMSV 178
 Dm LVRGQKVLDTGYPIRIPVGAETLGRIMNVIGEPIDERGPIDTDKTAAIHAEAPEFVQMSV 155
 Pf VVRGMECIDSGFPPIRIPVGPATLGRIMNVIGEPIDERGPVQTDKLLPIHAEAPEFVEMSV 173
 Sc LVRGEKVLDTGGPISVPGKATLGRIMNVIGEPIDERGPIKSKLRKPIHADPPSYAEQST 162
 Ec LRRGLDVKDLEHPLEVPGKATLGRIMNVIGEPIDMKGEGEERWAIHRAAPSYEELSN 122
 : ** * : : *** ***** : *

ATP-synt_ab Walker A

Pv EQEILVTGIKVVDLLAPYSKGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNVAKAHGGYSVFAGVGE 235
 Pl EQEILVTGIKVVDLLAPYSKGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNVAKAHGGYSVFAGVGE 235
 Cc EQEILVTGIKVVDLLAPYAKGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNVAKAHGGYSVFAGVGE 228
 Xl EQEILVTGIKVVDLLAPYAKGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNVAKAHGGYSVFAGVGE 235
 Bt EQEILVTGIKVVDLLAPYAKGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNVAKAHGGYSVFAGVGE 238
 Hs EQEILVTGIKVVDLLAPYAKGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNVAKAHGGYSVFAGVGE 238
 Dm EQEILVTGIKVVDLLAPYAKGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNVAKAHGGYSVFAGVGE 215
 Pf EQEILETGIKVVDLLAPYAKGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNVAKAHGGYSVFAGVGE 233
 Sc SAEILETGIKVVDLLAPYARGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNVAKAHGGYSVFAGVGE 222
 Ec SQELLETGIKVIDLMCPFAKGGKIGLFGGAGVGKTVNMMELIRNIAIEHSGYSVFAGVGE 182
 . * : * ***** : *

Pv RTREGNDLYHEMIESGVISLKDDTSKVSLVYGQMNPPGARARVALTGLTVAEYFRDQEG 295
 Pl RTREGNDLYHEMIESGVISLKDDTSKVSLVYGQMNPPGARARVALTGLTVAEYFRDQEG 295
 Cc RTREGNDLYHEMIESGVINLKDDTTSKVALVYGQMNPPGARARVALTGLTVAEYFRDQEG 288
 Xl RTREGNDLYHEMIESGVINLKDDTTSKVALVYGQMNPPGARARVALTGLTVAEYFRDQEG 295
 Bt RTREGNDLYHEMIESGVINLKDDTTSKVALVYGQMNPPGARARVALTGLTVAEYFRDQEG 298
 Hs RTREGNDLYHEMIESGVINLKDDTTSKVALVYGQMNPPGARARVALTGLTVAEYFRDQEG 298
 Dm RTREGNDLYHEMIESGVISLKDDTTSKVALVYGQMNPPGARARVALTGLTVAEYFRDQEG 275
 Pf RTREGNDLYHEMIESGVISLTDSTTSKVALVYGQMNPPGARARVALTGLTVAEYFRDQEG 293
 Sc RTREGNDLYHEMIESGVINLEGE-SKVALVYGQMNPPGARARVALTGLTVAEYFRDEEG 281
 Ec RTREGNDFYHEMTDSNVI-----DKVSLVYGQMNPPGNRLRVALTGLTMAEKFRD-EG 235
 ***** : * : *

Walker B

Pv QDVLLFIDNIFRFTQAGSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATDMGSMQERITTTKKSITSVQ 355
 Pl QDVLLFIDNIFRFTQAGSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATDMGTMQERITTTKKSITSVQ 355
 Cc QDVLLFIDNIFRFTQAGSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATDMGTMQERITTTKKSITSVQ 348
 Xl QDVLLFIDNIFRFTQAGSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATDMGTMQERITTTKKSITSVQ 355
 Bt QDVLLFIDNIFRFTQAGSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATDMGTMQERITTTKKSITSVQ 358
 Hs QDVLLFIDNIFRFTQAGSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATDMGTMQERITTTKKSITSVQ 358
 Dm QDVLLFIDNIFRFTQAGSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATDMGSMQERITTTKKSITSVQ 335
 Pf QDVLLFIDNIFRFTQAGSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATDMGTMQERITTTKKSITSVQ 353
 Sc QDVLLFIDNIFRFTQAGSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATDMGMLQERITTTKKSITSVQ 341
 Ec RDVLLFVDNIIYRYTLAGTEVSALLGRMPSAVGYQPTLAEEMGLQERITSTKTGSITSVQ 295
 : ***** : * : *

Pv AIYVPADDLTDPAPATTF AHLDATTVLSRGAELGIYPAVDPLDSTSRIMDANIIGHEHY 415
 Pl AIYVPADDLTDPA PATTF AHLDATTVLSRGAELGIYPAVDPLDSTSRIMDPNIIGAEHY 415
 Cc AIYVPADDLTDPA PATTF AHLDATTVLSRAIAELGIYPAVDPLDSTSRIMDPNIVGSEHY 408
 Xl AIYVPADDLTDPA PATTF AHLDATTVLSRAIAELGIYPAVDPLDSTSRIMDPNIVGLEHY 415
 Bt AIYVPADDLTDPA PATTF AHLDATTVLSRAIAELGIYPAVDPLDSTSRIMDPNIVGSEHY 418
 Hs AIYVPADDLTDPA PATTF ADL DATTVLSRAIAELGIYPAVDPLDSTSRIMDPNIVGSEHY 418
 Dm AIYVPADDLTDPA PATTF AHL DATTVLSRAIAELGIYPAVDPLDSTSRIMDPNIIGQEYHY 395
 Pf AIYVPADDLTDPA PATTF AHL DATTVLSRGAISELGIYPAVGPLDSTSRILDPNVVGQEHY 413

```

Sc      AVYVPADDLTDPPAPATTFHAHLDATTVLSRGISELGIYPAVDPLDSSRLLLDAAVVGQEHY 401
Ec      AVYVPADDLTDPPSPATTFHAHLDATVVLSRQIASLGIYPAVDPLDSSRQLDPLVVGQEHY 355
      *:*****:*****.***.***.*:*****.***.***.*:.*:.***
ATP-synt_ab_C
Pv      NVARAVQKILQDHKSLQDIIAILGMDELSEEDKLTVARARKIQKFLSQPFQVAEVFTGYS 475
Pl      NVARAVQKILQDHKSLQDIIAILGMDELSEEDKLTVARARKIQKFLSQPFQVAEVFTGYS 475
Cc      DVARGVQKILQDYKSLQDIIAILGMDELSEEDKLTVARARKIQRFLSQPFQVAEVFTGHL 468
Xl      DVARGVQKILQDYKSLQDIIAILGMDELSEEDKLTVSRARKIQRFLSQPFQVAEVFTGHL 475
Bt      DVARGVQKILQDYKSLQDIIAILGMDELSEEDKLTVSRARKIQRFLSQPFQVAEVFTGHL 478
Hs      DVARGVQKILQDYKSLHDIIAILGMDELSEEDKLTVSRARKIQRFLSQPFQVAEVFTGHM 478
Dm      NVARGVQKILQDYKSLQDIIAILGMDELSEEDKLTVARARKIQRFLSQPFQVAEVFTGHA 455
Pf      RVARGVQKILQDFRSLQDIIAILGMDELSEEDKLTVTRARKIQRFLSQPFQVAEVFTGSA 473
Sc      DVASKVQETLQTYKSLQDIIAILGMDELSEEDKLTVERARKIQRFLSQPFQVAEVFTGIP 461
Ec      DTARGVQSILQRYQELKDIIAILGMDELSEEDKLVVARARKIQRFLSQPFQVAEVFTGSP 415
      .* **.* **.*:*****:***.* *****:***** *****

Pv      GKFVSLPDPIRSFKELLAGKYDDLPEAPFYMOGSIEDVIEKAEQLAAQPS- 525
Pl      GKFVSLEKTIASFKELLAGKYDHLPKLPSTCRGDIQDVIEKAEQLATQGS- 525
Cc      GKLVPLKDTIKGFKAILGGEYDALPEQAFYMVGPIEEVVQKAEKLAAEHS- 518
Xl      GKLVPLKDTIKGFQQILHGAYDNLPEQAFYMVGPIEEAVTKAEKLAAEHS- 525
Bt      GKLVPLKETIKGFQQILAGEYDHLPEQAFYMVGPIEEAVAKADKLAAEHS- 528
Hs      GKLVPLKETIKGFQQILAGEYDHLPEQAFYMVGPIEEAVAKADKLAAEHS 529
Dm      GKLVPLEQTIKGFSAILAGDYDHLPEVAFYMVGPIEEVVEKADRLAKEAA- 505
Pf      GKYVPLKETILGFQQILQGDYDHLPEVAFYMVGNIEEVVQKAERLAAEEQS- 523
Sc      GKLVRLKDTVASFKAVLEGYDNIEHAFYMVGGIEDVVAKAEKLAAEAN- 511
Ec      GKYVSLKDTIRGFKIMEGEYDHLPEQAFYMVGSIEEAVEKAKL----- 460
      ** * * ..: .* :.* :* ** :*: . * *::: **.:*

```

Figura 8. Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia obtenida del ADNc de *ATPβ* de *P. vannamei* con *ATPβ* de otros organismos. Los signos debajo de las secuencias indican aminoácidos iguales (*), sustituciones conservativas (:) y sustituciones semiconservativas (.) . Se resalta en gris en la secuencia de *P. vannamei* las secuencias conservadas identificadas, los dominios están subrayados, y las columnas de aminoácidos resaltadas indican las sustituciones. Pv (*P. vannamei*), Pl (*P. leniusculus*), Bt (*B. taurus*), Hs (*H. sapiens*), Cc (*C. carpio*), Xl (*X. laevis*), Dm (*D. melanogaster*), Pc (*P. fucata*) Sc (*S. cerevisiae*), Ec (*E. coli*).

Al comparar región del precursor de *ATPα* de *P. vannamei* con los correspondientes de otras especies (Figura 6), se observó que la región en donde se localiza la secuencia del péptido señal presenta un valor menor de similitud que el resto de la secuencia que forma la proteína madura, lo anterior también se observó en la comparación de las secuencias de *ATPβ* de *P. vannamei* y de otros organismos (Figura 8), se ha reportado esa menor similitud del péptido señal en comparación con la proteína madura en distintos trabajos, sin embargo esta región del precursor presenta ciertas características como ausencia de aminoácidos con carga negativa y por el contrario preponderancia de aminoácidos básicos

(Breen, 1988; von Heijne, G. 1986) lo cual se encontró también en la secuencia de *P. vannamei*.

Los tres dominios característicos de las subunidades ATP α y ATP β fueron identificados, el dominio de la región amino terminal, el dominio donde se encuentra el sitio de unión a nucleótidos y el dominio de la región carboxilo terminal. La diferencia entre los dominios de las dos subunidades radica en la composición de aminoácidos, sin embargo, estos tienen estructura y función similar. El dominio ATP-synt_ab_N también llamado HerA-ATP Synthase barrel (Iyer *et al.*, 2004) es el que se encuentra en la región amino terminal, integrado en su mayoría por estructuras del tipo láminas- β , por lo general este dominio está formado por 90 aminoácidos que al plegarse toman la forma de algo que se le ha encontrado parecido a una corona, al parecer no es un elemento crítico en la formación del sitio activo. Se ha propuesto que los aminoácidos especie-específicos de este dominio tienen un papel importante al interactuar con el mismo dominio de la otra subunidad, según se trate de ATP α ó ATP β , o con otras subunidades del mismo complejo enzimático, las cuales se sabe tienen un menor grado de conservación. El dominio ATP-synt_ab_N tiene la forma de toroide y la función de unión de las subunidades ATP α y ATP β con el resto de las subunidades con las que tiene contacto (aquellas que forman el estátor) (Bakhtiari *et al.*, 1999,). El dominio ATP_synt_ab es el que se encuentra en el centro de la proteína, contiene el sitio de unión a nucleótidos (Abrahams *et al.*, 1994) dentro del cual se encuentran las secuencias conservadas Walker A y Walker B, que funcionan como sitios de unión a nucleótidos. Este dominio es, de los tres que componen a las subunidades ATP α y ATP β , el

que presenta el mayor grado de similitud cuando se compara con el de las proteínas de las bases de datos (GenBank), lo cual se asocia con su función en la catálisis enzimática, por lo que las diferencias especie-específicas encontradas en este dominio podrían resultar en características de catálisis específicas para la enzima de *P. vannamei*. El dominio ATP-synt_ab_C se encuentra en la región carboxilo terminal, está compuesto de 6 y 7 α -hélices en ATP α y ATP β respectivamente en la F₀F₁ATP-sintasa de bovino (Abrahams *et al.*, 1994), está formado únicamente por estructuras del tipo α -hélices y es el que tiene mayor contacto con el resto del complejo enzimático. Se encuentra dentro de este dominio la secuencia conservada DELSEED la cual interacciona con la ATP γ , al igual que ATP-synt_ab_N está menos conservado que ATP_synt_ab, presentado características especie-específicas, las cuales en un futuro pueden brindar información cuando existan otras secuencias de F₀F₁ATP-sintasa de otras especies de camarones. En la secuencia de aminoácidos de la subunidad β también se encontró la región conservada GERXXE, la cual está involucrada en la hidrólisis de ATP (Goswami y Adhya, 2006), esta secuencia no se encuentra en ATP α lo cual se atribuye a que GERXXE participa en la catálisis (Abrahams *et al.*, 1994). Se ha sugerido que el aminoácido M209 está físicamente cercano a la región GERXXE y al sustituir ese aminoácido en *E. coli* se observó un efecto negativo en la catálisis (Weber *et al.*, 1995). Además fue posible identificar la secuencia DELSEED, se ha encontrado que esta región de la secuencia de la subunidad β forma un lazo y tiene carga negativa, se encuentra en la región carboxilo terminal de la proteína, e interactúa con la subunidad γ (Futai M., 2006). En la F₀F₁ATP-sintasa de mitocondrias, se ha encontrado que la región amino terminal de la proteína IF₁ que inhibe la hidrólisis de ATP, interactúa con el

hexámero $\alpha_3\beta_3$ en una región próxima al carboxilo-terminal de la subunidad β donde se encuentra la secuencia conservada DELSEED (Jackson y Harris 1988).

6.3 Evaluación de los transcritos de *ATP α* y *ATP β* por PCR cuantitativa

El análisis de la concentración del ARNm de *ATP α* y *ATP β* en las branquias y los pleópodos de *P. vannamei* se realizó con muestras provenientes del bioensayo en el que los organismos se expusieron a condiciones de normoxia e hipoxia. Se registró el tiempo que transcurrió para que la concentración de OD llegara a la esperada en cada punto del muestreo (Tabla II), ya que la disminución de OD en el sistema estuvo relacionada al consumo de oxígeno por parte de los organismos, afectando la demanda energética de los mismos.

Tabla II. Tiempo transcurrido a lo largo del bioensayo del que se obtuvieron las muestras para la evaluación de la concentración de *ATP α* y *ATP β* en las branquias y los pleópodos de *P. vannamei*.

Oxígeno disuelto (mg/L)	No. de h
6	0
4	4
2	9
1.5	15
7	19

6.3.1 Integridad del ARN total

Se realizó la extracción del ARN total de 45 muestras de branquias y 45 muestras de pleópodos, así como la cuantificación y análisis de integridad de las mismas (Figura 9). El patrón de bandeo fue similar entre las muestras del mismo tejido. La visualización de bandas indica la presencia del ARN ribosomal y ARN de transferencia de las muestras analizadas.

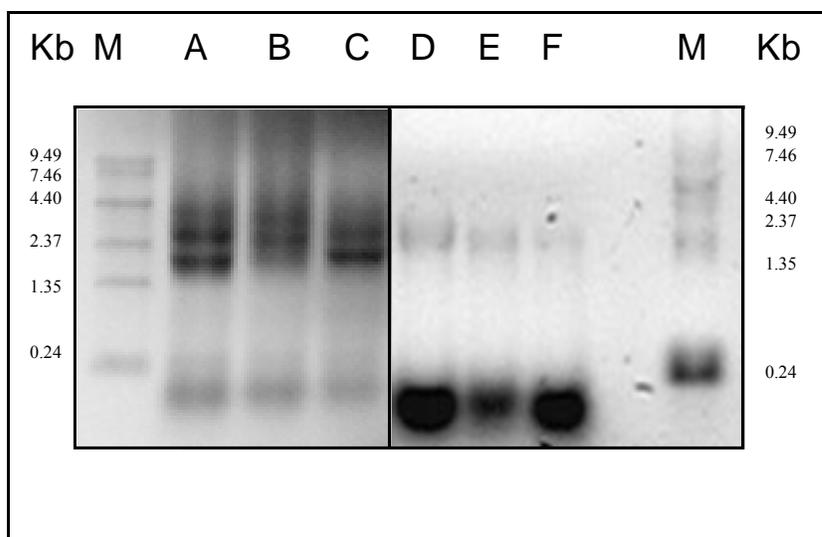


Figura 9. Integridad del ARN total. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. En el primer y último carril se muestra el marcador en pb, en los carriles A, B y C se muestra ARN total de branquias. En los carriles D, E y F se muestra ARN total de pleópodos.

6.3.2 Degradación de ADN genómico presente en las muestras de ARN total

El ARN total cuantificado e íntegro se trató con DNasa I para degradar el ADN genómico presente en las muestras. No se obtuvo amplificación al usar como hebra molde el ARN total tratado en reacción de PCR con los oligonucleótidos CO2FwCAM1 y CO2RvCAM1. A diferencia de los controles positivos en donde la pareja de oligonucleótidos antes mencionada amplificó un producto de 540 pb muestras con ADN genómico (Figura 10).

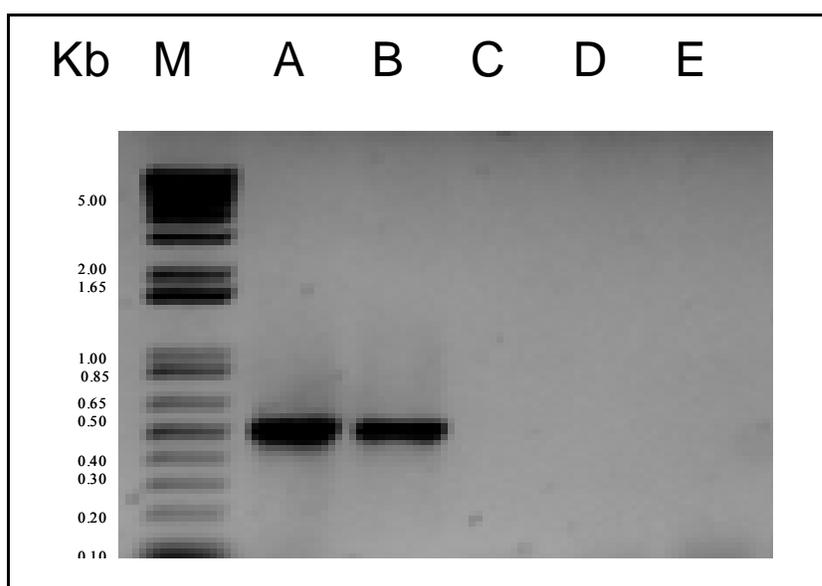


Figura 10. Evaluación de las muestras de ARN total con ADN genómico. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril M, marcador en pb, carril A y B controles positivos, tamaño del producto es de 547 pb. Carril C, control negativo. Carriles D y E corresponden a muestras de ARN total de pleópodos

6.3.3 Síntesis de ADNc y amplificación por PCR de *ATP α* y *ATP β*

Se sintetizaron 33 muestras de ADNc a partir del 33 del ARN total tanto de las branquias como de los pleópodos. Se realizó una prueba utilizando como hebra molde cada ADNc

sintetizado para tener la certeza de que la reacción de síntesis funcionó, la prueba consistió en la amplificación de un fragmento de *ATP α* ó *ATP β* (Figura 11).

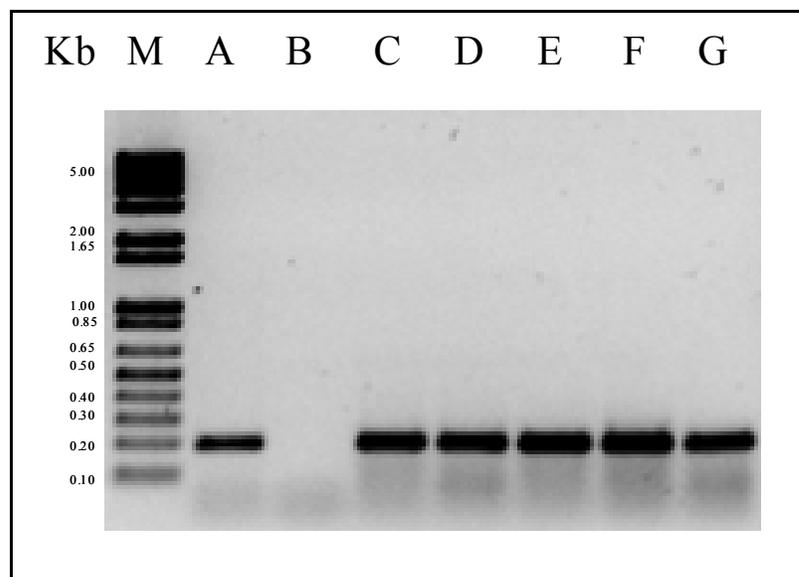


Figura 11. Fragmentos amplificados de *ATP β* de 205 pb a partir del ADNc de 5 diferentes muestras de pleópodos del camarón blanco *P. vannamei*. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, se muestran los productos de la subunidad β . Carril M marcador en pb, carriles A y B controles positivo y negativo respectivamente, carriles C-G productos de la amplificación por PCR de un fragmento de *ATP β* en ADNc de pleópodos

6.3.4 Cuantificación del ARNm de *ATP α* y *ATP β* por PCR cuantitativa

Se cuantificaron los transcritos de la proteína ribosomal *L8*, así como de las subunidades *ATP α* y *β* en las branquias y los pleópodos del camarón. Se construyó para cada gen a evaluar, una curva estándar con parámetros similares (Tabla III). Además se confirmó la amplificación de un solo producto específico por medio de una curva de disociación para cada transcrito.

Tabla III. Características de las curvas estándar construidas para la cuantificación de los transcritos por PCR cuantitativa.

Gen	Tejido	% Eficiencia	R ²	Pendiente	Intercepción en Y
<i>L8</i>	Branquias	104.30	0.99	-3.22	8.36
<i>ATPα</i>	Branquias	102.60	0.99	-3.26	9.70
<i>ATPβ</i>	Branquias	104.70	0.98	-3.22	6.59
<i>L8</i>	Pleópodos	104.70	0.99	-3.22	3.51
<i>ATPα</i>	Pleópodos	95.40	0.99	-3.44	8.11
<i>ATPβ</i>	Pleópodos	103.30	0.98	-3.24	9.49

6.3.4.1 Cuantificación de los transcritos *ATP α* , *ATP β* en las branquias

La expresión de *ATP α* en las branquias del camarón, relativa al gen constitutivo *L8* (Figura 12 A) mostró un incremento de 119 y 128 veces en las concentraciones de OD de 4 y 2 mg/L, respectivamente comparado con el grupo control en normoxia (6 mg/L) siendo este aumento estadísticamente significativo ($p < 0.05$, figura 15). La concentración de *ATP α* en 1.5 mg/L aumentó 2.8 veces con respecto al control ($p < 0.05$).

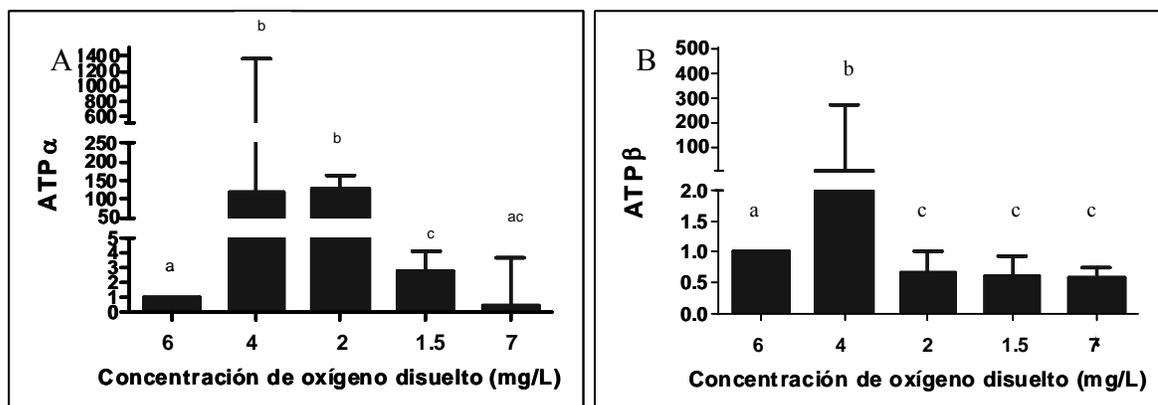


Figura 12. Cuantificación relativa de A) $ATP\alpha$ y B) $ATP\beta$ en las branquias de *P. vannamei*. Valores con diferente literal son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Al evaluar la concentración del ARNm de la subunidad $ATP\beta$ en las branquias del camarón usando a *L8* como gen constitutivo (Figura 12B) se encontró un aumento de 3 veces en 4 mg/L con respecto a aquellos en 6 mg/L ($p < 0.05$). Los tratamientos de 2, 1.5 y 7 mg/L de OD fueron menor a la concentración de ARNm de $ATP\beta$ detectada en el tratamiento de 6 mg/L.

6.3.4.2 Cuantificación de los transcritos $ATP\alpha$ $ATP\beta$ en los pleópodos

La expresión relativa de $ATP\alpha$ en los pleópodos del camarón normalizada con el gen constitutivo *L8* (Figura 13A) aumentó en la hipoxia y en la reoxigenación con respecto al control ($p < 0.05$). En hipoxia la mayor concentración del transcrito se detectó en 1.5 mg/L y fue 13 veces mayor que el control.

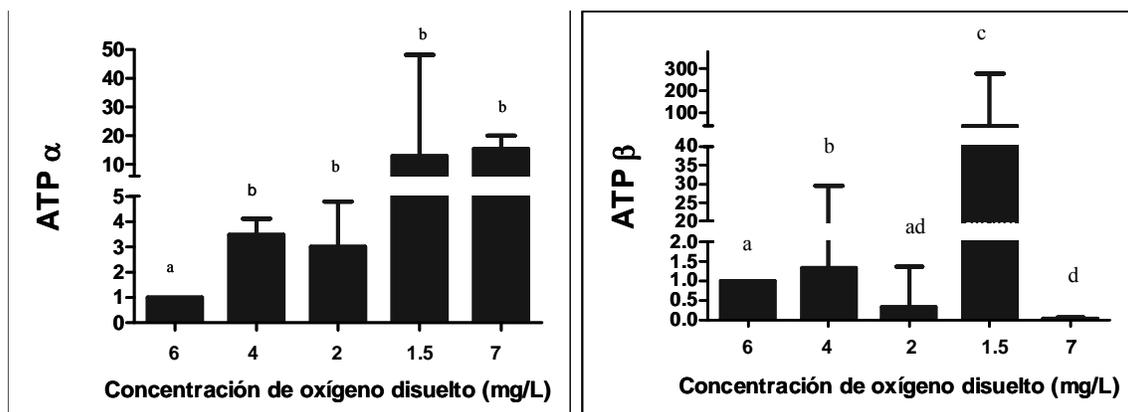


Figura 13. Cuantificación relativa de A) $ATP\alpha$ y B) $ATP\beta$ en los pleópodos de *P. vannamei*. Valores con diferente literal son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

La expresión relativa de $ATP\beta$ (Figura 13B) mostró diferencias entre los tratamientos ($p < 0.05$). Se observó un aumento de 1.3 veces en la concentración de ARNm en el tratamiento a 4 mg/L y de 43 veces en 1.5 mg/L con respecto a los camarones en normoxia. Durante la re-oxigenación (7 mg/L) se observó una disminución en la concentración de ARNm ($p < 0.05$).

7. DISCUSIÓN

7.1 Secuencias del ARNm de *ATP α* y *ATP β*

Gracias al estudio realizado en diferentes tipos de organismos en relación a los complejos enzimáticos que sintetizan ATP a través de un proceso similar, se encontró que el proceso en el que está implicada la traslocación de protones para la síntesis de ATP ocurre en organismos de diferente reino, en complejos enzimáticos evolutivamente relacionados, este es el caso de los complejos F₀F₁ATP-sintasa en eucariotas y algunos procariontes como bacterias y A₀A₁ATP-sintasa en archaia (Müller *et al.*, 2005).

La enzima F₀F₁ATP-sintasa funciona de una manera similar en todos los organismos eucariotes y cuenta con características estructurales altamente conservadas (Lei *et al.*, 2007, Walker *et al.*, 1985), sin embargo se ha encontrado que el complejo enzimático cuenta con características especie-específicas, como el número, y tipo de subunidades, estas características son diferentes entre organismos de diferente reino por ejemplo en organismos unicelulares como la bacteria *E. coli* y la levadura *S. cerevisiae*, por lo cual es importante la descripción de complejos de la F₀F₁ATP-sintasa en organismos que no son modelo de estudio como los crustáceos de los que no existe mucha información en relación a la F₀F₁ATP-sintasa.

En el presente trabajo se obtuvo la secuencia de nucleótidos del ARNm de dos subunidades implicadas en la catálisis de la F₀F₁ATP-sintasa, las subunidades *ATP α* y *ATP β* del camarón *P. vannamei*. Lo obtenido en este estudio sobre ambas subunidades confirma lo encontrado en otras especies de organismos eucariotes, como el organelo en el que están

codificadas, el número aminoácidos por el que están compuestas, la similitud entre ambas subunidades, la ausencia del aminoácido W, así como los dominios que presentan.

Para el caso de la secuencia deducida de aminoácidos de $ATP\alpha$ de *P. vannamei*, el mayor grado de identidad lo presentó con la secuencia de la misma proteína del gusano de la seda *B. mori*, un organismo artrópodo al igual que el organismo objeto de estudio del presente trabajo. Mientras que la secuencia deducida de aminoácidos de $ATP\beta$ presentó el mayor grado de identidad con la misma proteína de *P. leniusculus*, un langostino del norte de América, lo que sugiere una relación filogenética cercana entre estos organismos, a reserva de mayores estudios. Esta nueva información ahora disponible sobre *P. vannamei* permitirá profundizar en el estudio del ARNm de $ATP\alpha$ y $ATP\beta$ o el gen, en busca de isoformas o isoenzimas, o en el estudio de las proteínas. En especial investigar si las sustituciones que se identificaron en el ARNm de $ATP\alpha$ y $ATP\beta$ como específicos de *P. vannamei* o de organismos artrópodos. De las sustituciones identificadas, solo unas pocas se consideró que pudieran tener efecto en la función de la F_0F_1 ATP-sintasa, en $ATP\alpha$ se identificaron 2 sustituciones no conservativas, A→C487 y R→A524 las cuales están en el dominio ATP-synt_ab_C el cual interactúa con el resto del complejo. Para el caso de $ATP\beta$ las sustituciones no conservativas que pudieran tener efecto en la función son, K6R→S59 en la que el aminoácido en *P. vannamei* es menor en comparación con el que presentan el resto de los organismos, T→P484 podría ser relevante ya que la presencia del aminoácido P afecta la estabilidad de la estructura secundaria, A→S194 podría tener importancia ya que podría afectar la hidrofobicidad de la región en la que se encuentra la sustitución, y por estar a 9 aminoácidos de Walker A podría ser relevante, ya que el lazo que forma esta

región de la subunidad cambia de conformación durante la unión de nucleótidos y durante la hidrólisis de ATP. En relación a las sustituciones A→P503 y V→Q507 la primera podría significar un cambio en la estabilidad de la estructura secundaria y la segunda sustitución consiste en un aminoácido hidrofílico por uno hidrofóbico en los demás organismos, estas sustituciones se encuentran en el dominio ATP-synt_C el cual interactúa con otras subunidades del complejo. Si bien se ha encontrado que la sustitución de un solo aminoácido puede afectar la actividad enzimática de una proteína, como por ejemplo la trifosfato isomerasa de *Vibrio marinus* (Alvarez *et al.*, 1998). Solo con experimentos posteriores se puede determinar, si las diferencias encontradas son específicas para peneidos, y si estas diferencias tienen algún efecto en la función.

7.2 Concentración del ARNm de ATP α y ATP β en hipoxia

El efecto de la exposición a hipoxia se ha descrito ampliamente en diferentes organismos, en crustáceos se sabe que este fenómeno puede causar cambios en la transcripción de algunos genes (Bell *et al.*, 2003; Brown-Peterson *et al.*, 2008; David *et al.*, 2005), por lo que como un primer acercamiento al estudio de una posible regulación a nivel transcripcional de ATP α y ATP β en *P. vannamei*, se expusieron organismos de esta especie a hipoxia de una forma gradual, con la intención de afectar una parte del metabolismo celular ligado a la F₀F₁ATP-sintasa, alterando la concentración del oxígeno, un elemento clave en la fosforilación oxidativa.

7.2.1 Branquias

Los resultados de la cuantificación de *ATP α* en las branquias sugieren que ante condiciones de hipoxia existe control durante la transcripción de esta subunidad. Las mayores concentraciones del transcrito se detectaron a 4 y 2 mg/L de OD. El aumento detectado en la concentración de 4 mg/L de OD que fue el primer punto en hipoxia, se atribuye a la demanda metabólica generada por un aumento en la ventilación, ya que se ha reportado que al inicio de la exposición a hipoxia en los crustáceos ocurre un aumento de la ventilación (Burggren y McMahon, 1983), y concuerda con lo reportado para *P. vannamei* sobre las primeras respuestas antes condiciones de hipoxia, un aumento en la actividad física y movimientos natatorios al azar (Zhang *et al.*, 2006) El aumento de la ventilación podría implicar la formación de nuevos complejos de la F₀F₁ATP-sintasa debido a un aumento en la demanda de ATP, a causa de una mayor actividad en las branquias.

Con respecto a *ATP β* en las branquias, la concentración de este transcrito aumentó en 4 mg/L de OD lo cual podría estar relacionado al aumento de la ventilación al igual que se discutió para *ATP α* . Se puede observar en las gráficas que los aumentos no fueron proporcionales, es decir que *ATP α* aumentó un número de veces mayor que *ATP β* , ya que en 4 mg/L *ATP α* fue aproximadamente 100 veces mayor al control, mientras que *ATP β* fue tan solo 3 veces mayor al control. La concentración de *ATP β* en 2, 1.5 y 7 mg/L de OD fue menor al control (6 mg/L de OD) lo que puede estar relacionado a un cambio en la estabilidad del ARNm o a una menor tasa de transcripción ante la disminución de la tasa metabólica en 2 y 1.5 mg/L de OD, el que se haya mantenido estable la concentración de

ATP β a partir de 2 mg/L y hasta la reoxigenación puede deberse a que en esas concentraciones de oxígeno la subunidad β estuvo regulada a nivel traduccional o postraduccional, lo cual solo se podrá determinar a través experimentos adicionales.

Es importante resaltar lo que se encontró en las branquias con respecto a los transcritos en la reoxigenación del sistema, *ATP α* a 7 mg/L con respecto al control no fue diferente, mientras que la concentración de *ATP β* en 7 mg/L fue menor al control. Esto resulta interesante ya que la reoxigenación de tejidos hipóxicos contribuye de manera importante a la formación de especies reactivas de oxígeno, las cuales pueden causar daño a macromoléculas celulares, como ácidos nucleicos, lípidos de membrana y proteínas (Halliwell y Gutteridge, 2001). Zenteno-Savín *et al.*, 2006 al someter a *P. vannamei* durante 24 h a una concentración de 1mg/L y posteriormente 6 h a 6 mg/L de OD, no detectaron señales de estrés oxidativo en las branquias. Lo cual habla de la plasticidad de este tejido en lo relacionado al estrés oxidativo, que por su función no resulta extraño que cuente con mecanismos que le permitan no ser afectado en ese sentido. Lo anterior coincide con los resultados del presente estudio, desde el punto de vista que la reoxigenación no produjo un efecto importante en la transcripción de *ATP α* y sin embargo *ATP β* fue menor que el control en la reoxigenación, lo que puede estar relacionado el efecto de la regulación de la transcripción por la concentración de OD.

7.2.2 Pleópodos

Al haber detectado diferencias estadísticas en la concentración del ARNm de $ATP\alpha$, se sugiere que la hipoxia provoca un efecto en la transcripción de esta subunidad. Se observó un aumento en la concentración del ARNm de $ATP\alpha$ en las condiciones hipoxia y en la reoxigenación, la concentración del transcrito en 1.5 mg/L fue aproximadamente 12 veces mayor con respecto a normoxia puede estar relacionado lo cual puede relacionarse a pleópodos y la capacidad de responder ante condiciones de anaerobio por ser un tejido involucrado en la actividad física.

Con respecto a la concentración de ARNm de $ATP\beta$ en los pleópodos de *P. vannamei* los resultados sugieren una regulación a nivel de transcripción debido a las diferencias encontradas entre los tratamientos. La tendencia de $ATP\alpha$ y el aumento detectado de $ATP\beta$ en 4 mg/L de OD puede obedecer a un aumento de la actividad física en busca de lugares con una mayor concentración de oxígeno (Morris y Airriess, 1988), mientras que el incremento encontrado en 1.5 mg/L de OD puede estar relacionado a la reorganización del metabolismo. El que la diferencia encontrada en 1.5 mg/L de OD haya sido tan marcada con respecto al control puede estar relacionado a que los pleópodos son tejidos involucrados en la actividad física o traslado del camarón, y a que de acuerdo a lo encontrado en otros organismos en este tipo de tejidos el metabolismo anaeróbico contribuye de manera importante a la síntesis de moléculas energéticas durante el desarrollo de actividad física por cierto período de tiempo, por lo que debe de contar con los mecanismos metabólicos necesarios para sintetizar ATP de forma anaerobia, a partir de las

reservas energéticas (Hamilton y Houlihan, 1992). El aumento de los transcritos en las concentraciones más bajas de oxígeno, para el caso de los pleópodos concuerda con lo reportado por Rissanen *et al.*, (2006) quienes al someter a diferentes concentraciones de oxígeno hepatocitos de *Oncorhynchus mykiss*, encontraron que en la concentración más baja de oxígeno evaluada tanto la concentración de ATP como la del transcrito *ATP6* se restablecieron a las concentraciones encontradas en normoxia, lo anterior se puede deber a la reorganización del metabolismo. Sin embargo con los análisis realizados en dicho estudio no queda claro si la inducción de las rutas glucolíticas y por tanto de las enzimas glucolíticas es responsable del restablecimiento de la concentración de ATP así como del transcrito de *ATP6*. Además Brouwer *et al.*, (2007) encontraron resultados similares a lo encontrado en el presente trabajo en el camarón *P. pugio*, ellos detectaron una mayor concentración de *ATP_f* al someter a los organismos por 3 d a 1.5 mg/L de OD. Un dato interesante sobre este trabajo es que se evaluó también la cantidad del transcrito de *ATP_d* y *ATP_b* y solo se encontraron diferencias en *ATP_f*, esto brinda información importante sobre el control específico bajo el que están sujetas las diferentes subunidades de la F₀F₁ATP-sintasa, lo cual es de esperarse debido entre otras cosas a la participación del complejo de manera importante en el mantenimiento de la homeostasis celular y lo que esto significa. Estos son antecedentes importantes en cuanto a la reorganización del metabolismo en las concentraciones bajas de oxígeno y un aumento en la concentración de transcritos, como se observó en *ATP_α* en branquias y *ATP_β* en pleópodos.

En relación a la reorganización del metabolismo cuando este entra en fase anaerobia, en un estudio en el que se compararon las concentraciones de lactato en hemolinfa, bajo

condiciones de normoxia en las branquias, glándula digestiva y músculo de *P. vannamei*, en músculo se encontró una concentración significativamente mayor (Zenteno-Savín *et al.*, 2006), además el músculo y la glándula digestiva son considerados los principales órganos de almacenamiento de metabolitos de reserva energética (Schirf *et al.*, 1987), por lo que debido a la función de los pleópodos podría tener sentido que la síntesis anaerobia de ATP afecte de forma diferente la transcripción de *ATP α* y *ATP β* en los pleópodos en comparación a las branquias.

La concentración de determinado ARNm en un tejido puede estar regulado por el estado de poliadenilación, por la interacción del transcrito con proteínas que participan en la regulación de la transcripción, además cambios en la tasa de degradación del ARNm y en la tasa de síntesis (McCarthy y Kollmus, 1995). Por lo que las diferencias en los cambios en la concentración de ARNm de *ATP α* y *ATP β* , es decir el que estos cambios no hayan ocurrido en forma proporcional, puede deberse a diferentes mecanismos de regulación, como un aumento en la estabilidad del ARNm de uno o a un aumento en la tasa de degradación de otro. También puede deberse a lo encontrado en un estudio con ratas Fischer 344 en el que encontraron que la expresión de los transcritos de 8 diferentes subunidades de la F₀F₁ATP-sintasa entre ellos *ATP β* , tuvo la siguiente proporción de los transcritos: β_8 b_1 c_3 d_2 e_3 F_6_3 $OSCP_1$ lo cual difiere con la proporción que presentan las subunidades de la enzima α_3 β_3 g_1 d_1 IF_1_1 a_1 b_2 c_{10} d_1 e_2 $A6L_1$ F_6_2 $OSCP_1$ (no se evaluó a la subunidad α) (Himeda *et al.*, 2000). Lo anterior puede estar en función a una regulación específica para cada subunidad.

El estudio de la concentración de los transcritos de las subunidades α y β de la F_0F_1 ATP-sintasa en los tejidos de las branquias y los pleópodos, sugiere la existencia de regulación a nivel de la transcripción de una forma tejido-específica y de forma diferente para cada uno de estos genes en *P. vannamei*, lo cual se ha sugerido para otros organismos (Fernández-Silva, 2003). Lo anterior concuerda con lo reportado por David *et al.*, (2005) quienes expusieron a hipoxia al ostión *Crassostrea gigas* y encontraron que a las 24 y 168 h los transcritos de algunas de las subunidades de la NADH deshidrogenasa y de la citocromo oxidasa fueron regulados positivamente, mientras que otras subunidades de los mismos complejos en el mismo experimento, fueron regulados de manera negativa, la subunidad α de la F_0F_1 ATP-sintasa fue regulada de forma negativa a los 7 días (el estudio se llevó a cabo en las branquias, el manto y la glándula digestiva). Lo encontrado por David *et al.*, (2005) sugiere una alta complejidad en la regulación de la transcripción en hipoxia al encontrar un aumento y posteriormente una disminución de los transcritos de las subunidades de un mismo complejo enzimático, lo cual coincide con el presente trabajo y que puede estar relacionado o no a un cambio en la actividad enzimática de la F_0F_1 ATP-sintasa o un cambio en la regulación de los transcritos. Las diferencias en las concentraciones de los transcritos para el caso de un mismo gen, se atribuye a la función particular de cada tejido, la cual determina una demanda de energía particular para cada tejido (Attardi *et al.*, 1990).

Se observó en el presente trabajo, una gran dispersión de los datos de la concentración de ARNm en algunas de las concentraciones de oxígeno evaluadas, lo cual se puede relacionar a lo encontrado por *Chim et al., (2003)* quienes al exponer a *Litopenaeus stylirostris* a diferentes salinidades detectaron que la variación entre organismos se ve incrementada por el estrés. *Koehn y Bayne (1989)* encontraron que bajo estrés por concentración de oxígeno la variación entre los individuos es mayor que en condiciones normales, los autores atribuyen esta alta variación a que la diferente respuesta de los organismos ante condiciones de hipoxia debido al distinto balance de energía que existe en cada individuo.

Integrando la información que se obtuvo en el presente estudio con lo obtenido por *Muhlia-Almazán et al., 2008* y *Martínez-Cruz 2007* en los que se estudió la concentración del ARNm de las subunidades *ATP6* (gen mitocondrial) y *ATP9* (gen nuclear) de la F_0F_1 ATP-sintasa de *P. vannamei*, se puede intentar establecer una visión más general. En el trabajo de *Muhlia-Almazán et al., 2008* se cuantificó la concentración del ARNm de las subunidades antes mencionadas en los diferentes estadios de muda y se sugirió la regulación de la transcripción de *ATP6* y *ATP9* en la glándula digestivas, asociaron la posible regulación en función de la demanda de energía del camarón en los diferentes estadios (*Muhlia-Almazán et al., 2008*). Mientras que en el estudio de *Martínez-Cruz 2007* se evaluó la concentración de ARNm de las mismas subunidades de la F_0F_1 ATP-sintasa en condiciones de hipoxia, y en este último también se encontraron evidencias de una posible regulación en la transcripción de ambas subunidades, en este caso de forma tejido específica, ya que se detectaron cambios en la concentración de ambos transcritos en la

glándula digestiva, mientras que en músculo solo se encontraron diferencias en *ATP9* de igual manera se asoció la concentración de los transcritos a la demanda de ATP específica para cada tejido (Martínez-Cruz, 2007). Entonces la información sugiere que la transcripción de *ATP α* , *ATP β* , al igual que lo sugerido por Muhlia-Almazán *et al.*, 2008 para *ATP6* y *ATP9* de *P. vannamei* está reguladas de forma tejido específica, en relación a la demanda de energía de cada tejido, a reserva de los demás procesos de regulación a los que está sujeta la enzima. Así que ante condiciones de estrés el camarón *P. vannamei* genera una serie de respuestas como parte de la reorganización del metabolismo que le permite aclimatarse, el presente estudio aporta nuevas evidencias que apoyan la sugerencia que dentro de tales respuestas se encuentra la modulación de la F₀F₁ATP-sintasa.

Los cambios en la concentración de los ARNm de las subunidades *ATP α* y *ATP β* encontrados en el presente trabajo podrían servir como punto de referencia al evaluar la actividad enzimática de la F₀F₁ATP-sintasa de *P. vannamei* expuesto a diferentes concentraciones de oxígeno y determinar en que casos los cambios en la concentración del ARNm de alguna de las subunidades corresponden a un cambio en la actividad enzimática.

8. CONCLUSIONES

El estudio sobre la F_0F_1 ATP-sintasa en peneidos se encuentra en la etapa descriptiva, por lo que este es un estudio pionero acerca de la regulación de dos de las unidades catalíticas que forman al complejo enzimático. Aún es mucho lo que falta por conocer sobre el resto de las subunidades para llegar a entender como se relacionan estas para llevar a cabo la función.

Los resultados de este estudio indican que el ARNm de la subunidad α y el de la subunidad β de la F_0F_1 ATP-sintasa de *P. vannamei* son conservadas con relación a las subunidades descritas en diversos taxas, sobre todo artrópodos.

Los resultados sugieren además que las subunidades α y β de la F_0F_1 ATP-sintasa de *P. vannamei* están bajo control transcripcional, de forma independiente para cada una de estas subunidades y en función del papel de las branquias y los pleópodos en el metabolismo, además tal regulación forma parte de las respuestas que le permiten al organismo tolerar las condiciones de hipoxia.

9. REFERENCIAS

- Abrahams, J., Leslie, A., Lutter, R., Walker, J. 1994. Structure at 2.8Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*. 370:621-628.
- Alberts, B., Jhonson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2008. *Molecular biology of the cell*. Garland Science. USA.
- Allen, F. 2002. The function of genomes in bioenergetic organelles. *Phil Trans R Soc Lond B*. 358:19-38.
- Alvarez, M., Zeelen, V., Mainfroid, F., Rentier-Delrue, J., Martial, L., Wyns, R., Wierenga, D. 1998. Triose-phosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. Kinetic and structural properties. *J. Biol. Chem.* 273:2199–2206.
- Attardi, G., Chomyn, A., King, M., Kruse, B., Polosa, P., Murdter, N. 1990. Regulation of mitochondrial gene expression in mammalian cells. *Biochem Soc Trans.* 18:509-13.
- Ballard, J., Whitlock, M. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Mol Ecol.* 13:729-744.
- Bakhtiari, N., Lai-Zhang, J., Yao, B., Muellers, D. 1999. Structure/function of the β -Barrel domain of F1-ATPase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 274:16363-16369.
- Bell, G., Eggleston, D., Wolcott, T. 2003. Behavioral responses of free-ranging blue crabs to episodic hypoxia. I. Movement. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 259: 215–225.
- Bernardi, P. 1999. Mitochondrial Transport of Cations: Channels, Exchangers and Permeability Transition. *Physiol Rev.* 79:1127-1155.
- Blis, J. 1985. *The Biology of Crustacea*. Academic Press London- Ru.9.
- Boyer, P. 1997. The ATP synthase- A splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem.* 66:717-49.
- Breen, G. 1988. Bovine liver cDNA clones encoding a precursor of the α subunit of the mitochondrial ATP synthase complex. *Biochem Bioph Res Co.* 152:264-269.
- Bridges, C. 2001. Modulation of haemocyanin oxygen affinity: properties and physiological implications in a changing world. *J Exp Biol.* 204:1021–32.
- Brouwer, M., Brown-Peterson, N., Hoexum-Brouwer, T., Manning, S., Denslow, N. 2008. Changes in mitochondrial gene and protein expression in grass shrimp *Palaemonetes pugio*, exposed to chronic hypoxia. *Mar Environ Res.* 66:143–145.

- Brouwer, M., Li, T. 2007. Hypoxia-inducible factor, gsHIF, of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*: Molecular characterization and response to hypoxia. *Comp Biochem Phys.* 147:11-19.
- Brown-Peterson, N., Manning, S., Patel, V., Denslow, N., Brouwer, M. 2008. Effects of cyclic hypoxia on gene expression and reproduction in a grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Biol. Bull.* 214:6-16.
- Burggren, W., McMahon, B. 1983. An analysis of scaphognathite pumping in the crayfish *Orconectes virilis*: compensatory changes to acute and chronic hypoxia. *Physiol. Zool.* 56:309–318.
- Burger, J., Smythe, C. 1953. The general form of circulation in the lobster, *Homarus*. *J Cell Physiol.* 42:369-383.
- Butler, P., Taylor, E., McMahon, B. 1978. Respiratory and circulatory changes in the lobster *Homarus vulgaris* during long-term exposure to moderate hypoxia. *J. Exp. Biol.* 73, 131–146.
- Catterall, W., Pedersen, P. 1971. Adenosine Triphosphatase from Rat Liver Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 246:4987-4994.
- Chim, L., Bouveret, R., Lemaire, P., Martin, J. 2003. Tolerance of the shrimp *Litopenaus stylirostris*, Stimpson 1894, to environmental stress: interindividual variability and selection potential for stress-resistant individuals. *Aquaculture Research*, 34, 629-632.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Claros M. and Vincens P. 1995. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem.* 241:770-786.
- Clegg, J. 1997. Embryos of *Artemia franciscana* survive four years of continuous anoxia: the case for the complete metabolic rate depression. *J. Exp. Biol.* 200:467-475.
- Connor, M., Takahashi, M., Hood, D. 1996. Tissue-specific stability of nuclear and mitochondrially encoded mRNAs. *Arch. Biochem. Biophys.* 333:103-108.
- Dall, W., Hill, P., Sharples, D. 1990. The biology of the penaeidae. In: Blaxter, J., Southward, A. (Eds.), *Advances in Marine Biology*. 27 Academic Press., London :489.

- David, E., Tanguy, A., Pichavant, K., Moraga, D. 2005. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *Eur J Biochem.* 272:5635–5652.
- Devin, A., Rigoulet, M. 2007. Mechanisms of mitochondrial response to variations in energy demand in eukaryotic cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 292: C52–C58.
- Di Lisa, F., Menabo, R., Canton, M., Petronilli, V. 1998. The role of mitochondria in the salvage and the injury of the ischemic myocardium. *Biochim Biophys Acta.* 1366:69-78.
- Domínguez-Ramírez, L., Gómez-Puyou, T. 2005. La F_1F_0 ATP-sintasa: un complejo proteico con gran versatilidad estructural y funcional. *Tip revista especializada en Ciencias Químico Biológicas.* 8:18-27.
- Domínguez-Ramírez, L., M., Gómez-Puyou. 2003. Virtudes y Pecados de una Enzima: la F_0F_1 ATP-sintasa. *Mensaje Bioquímico.* 27:25-44.
- Egea, G., Izquierdo, J., Ricart, J., San Martín, C. and Cuezva J. 1997. mRNA encoding the b-subunit of the mitochondrial F_1 -ATPase complex is a localized mRNA in rat hepatocytes. *Biochem. J.* 322:557-565.
- Egusa, S. 1961. Studies on the respiration of the “Kuruma” prawn, *Penaeus japonicus* Bate. II. Preliminary experiments on its oxygen consumption. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 27: 650–659.
- Epstein, A., Gleadle, J., McNeil, L., Hewitson, K., O'Rourke, J., Mole., Mukherji M., Metzen, E., Wilson, M., Dhanda, A. 2001. *Cell.* 107:43-54.
- Falson, P., Goffeau, A., Boutryb, M., Jaultc, J. 2004. Structural insight into the cooperativity between catalytic and noncatalytic sites of F_1 -ATPase. *Biochim Biophys Acta.* 1658:133-140.
- Fandrey, J., Garr, T., Gassmann, M. 2006. Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation. *Cardiovasc. Res.* 71:642-651.
- Alday de Graindorge., Flegel, T. 1999. CD-ROM. FAO, Rome Italy, and Multimedia Asia Co., Ltd 1999. Diagnosis of shrimp diseases: with emphasis on the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*).
- Fernández-Silva, P., Enriquez, J., Montoya, J. 2003. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol.* 88:41-56.
- Flores, A., Cuezva, J. 1997. Identification of sequence similarity between 60 kDa and 70 kDa molecular chaperones: evidence for a common evolutionary background?. *Biochem J.* 322:641-647.

- Flück, M., Webster, K., Gram, J., Giomi, F., Gerlach, F., Schmitz, A. 2007. Integr. Comp. Biol. 47: 524-531.
- Futai, M. 2006. Our research on proton pumping ATPases over three decades: their biochemistry, molecular biology and cell biology. Proc Jpn Acad Ser B. 82:416-438.
- Futai, M., Noumi, T., Maeda, M. 1988. Molecular genetics of F₁-ATPase from *Escherichia coli*. J Bioenerg. Biome. 20:41-58.
- Go swami, S., Madhya, S. 2006. The α -subunit of *Leis mania* F1 ATP synthase hydrolyzes ATP in the presence of tuna. J. Chem. Biol. 281:18914-18917.
- Grace, A., Troll, J., Somers, G. 2001. Hypoxia-induced gene expression profiling in the erotic fish *Gillichthys mirabilis*. P Natl Acad Sci USA. 98:1993-1998.
- Hagerman, L. 1986. Haemocyanin concentration in the shrimp *Crangon crangon* (L.) after exposure to moderate hypoxia. Comp. Biochem. Physiol. 85A:721-724.
- Hagerman, L., Szaniawska, A. 1994. Haemolymph nitrogen compounds and ammonia efflux rates under anoxia in the brackish water isopod *Saduria entomodon*. Mar. Ecol. Progr. Ser. 103, 285-289.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. 2001. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, Oxford, UK. 936 .
- Hamilton, N., Houlihan, D. 1992. Respiratory and circulatory adjustments during aquatic treadmill exercise in the European shore crab *Carcinus maenas*. J Exp Biol. 162:37-54.
- Herreid, C. 1980. Review Hypoxia in invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. 67A:311-320.
- Hervant, F., Mathieu, J. Culver, D. 1999. Comparative responses to severe hypoxia and subsequent recovery in closely related amphipod populations (*Gammarus minus*) from cave and surface habitats. Hydrobiologia. 392:197-204.
- Hevner, R., Margaret, T. Riley, W. 1993. Mitochondrial and nuclear gene expression for cytochrome oxidase subunits are disproportionately regulated by functional activity in neurons. J Neurosci. 13:1805-1819.
- Amida, T., Morokami, K., Arakaki, N., Shibata, H. Higuti, T. 2002. Synchronized transcriptional gene expression of H1-ATP synthase subunits in different tissues of Fischer 344 rats of different ages. Eur J Biochem. 267:6938-6942.

- Hochachka, P., Buck, L., Doll, C., Land, S. 1996. Unifying theory of hypoxia tolerance: Molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. Proc. Natl. Acad. Sci. 93:9493-9498.
- Hochachka, P., Monger, C. 2000. Evolution of human hypoxia tolerance physiology. Adv. Exp. Med. Biol. 475:25-43.
- Hochachka, P., Somero, G. 2002. Biochemical adaptation, mechanism and process in physiological evolution. Oxford University press. New York. 466.
- Hopkins, J., Stokes, A., Browdy, C., Sandifer, P. 1991. The relationship between feeding rate, paddle-wheel aeration rate and expected dawn dissolved oxygen in intensive shrimp ponds. Aquacult. Eng. 10:281–290.
- Hsin-Chen, L., Yau-Huei, W. 2000. Mitochondrial role in life and death of the cell. J Biomed. Sci.7:2-15.
- Ibarra ,A., Pérez-Rostro, C., Ramírez, J., Ortega-Estrada, E. 2007. Genetics of the resistance to hypoxia in postlarvae and juveniles of the Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Boone 1931). Aquac. Reser. 38:838-846.
- Ida K., Noumi, T., Maeda M., Foque, T., Faltai, M. 1991. Catalytic Site of F1-ATPase of Escherichia coli. J. Biol. Chem. 266:5424-5429.
- Iko, Y., Sambongi, Y., Tanabe, M., Iwamoto-Kihara, A., Saito, K., Ueda, I., Wada, Y., Futai, M. 2001. ATP Synthase F1 Sector Rotation. J. Biol. Chem. 276:47508:47511.
- Itoi, S., Kinoshita, S., Kikuchi, K., Watabe, S. 2002. Changes of carp FoF1-ATPase in association with temperature acclimation. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 284:R153–R163.
- Iyer, L., Makarova, Kira., Koonin V., Aravind, L. 2004 Comparative genomics of the FtsK-HerA superfamily of pumping ATPases: implications for the origins of chromosome segregation, cell division and viral capsid packaging. Nucleic Acids Res 32(17):5260-5279.
- Jackson, P., Harris, D. 1988. The mitochondrial ATP synthase inhibitor protein binds near the C-terminus of the F₁ b-subunit. FEBS Lett. 229, 224–228.
- Koehn, R., Bayne B. 1989. Towards a physiological and genetic understanding of the energetics of the stress response. Biol. J. Linn. Soc. 37:157– 171.
- Kozlov, I., Milgrom, Y., Tsybovski I. 1980. Isolation of alpha-subunits of factor F1 from submitochondrial particles and the reconstitution of active ATPase from isolated alpha-subunits and beta-subunits bound to the mitochondrial membrane. Biochem J. 192:483-488.

- Larade, K., Storey, K. 2002. *Sensing, Signalling and Cell Adaptation*. A profile of the metabolic responses to anoxia in marine invertebrate. Elsevier Press, Amsterdam. 3:1-30.
- Lei, C., Xude, S., Hongwei, B., Shande, Y., Liping, X., Xunhao, X., Rongqing, Z. 2007. Cloning, characterization, and distribution of an mRNA encoding a H⁺-ATPase α subunit in the mantle of Pearl Oyster, *Pinctada fucata*. *Tsinghua Science and Technology*.4:405-412.
- Liao, I., Huang, H. 1975. Studies on the respiration of economic prawns in Taiwan. I. Oxygen consumption and lethal dissolved oxygen of egg up to young prawn of *Penaeus monodon* Fabricius. *J. Fish. Soc. Taiwan* 4:33-50.
- Livak, K., Schmittgen, T. 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 25:402-408.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Zipursky, S., Dornell, J. 1995. *Molecular Cell Biology*. FREEMAN, USA.,
- Luis, A., Aleonada, A., Cuezva, J. 1990. The α regulatory subunit of the mitochondrial F1 ATPase complex is a heat-shock protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 265:7713-7716.
- Lutz, P., Prentice, H. 2002. Sensing and responding to hypoxia, molecular and physiological mechanisms. *Integr. Comp. Biol.* 42:463-468.
- Magallón, P. 2004. Tesis de maestría: Evaluación de moléculas asociadas al sistema inmune, bajo condiciones agudas de hipoxia en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, Borne, 1931. Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste, a.C.
- Martínez-Córdova, L., Villa real-Colmenares, H., Cortés-Jacinto., E. 2001. Biología del camarón. En: Martínez-Córdova L., Chamaron cultura. AGT S.A. México.2-3.
- Martínez-Cruz, O. 2007. Tesis maestría: Expresión génica de las subunidades ATP6 mitocondrial y ATPc nuclear del complejo ATP-Sintasa en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en condiciones de hipoxia. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.
- McCarty, R. 1992. A plant biochemist's view of H⁺-ATPases and ATP synthases. *J. exp Biol.* 172:431-441.
- McMahon, B. 2001. Respiratory and circulatory compensation to hypoxia in Crustaceans. *Resp. Physiol.* 128:349-364.
- McMahon, B., Burggren, W., Wilkens, H. 1974. Respiration responses to long-term hypoxic stress in the crayfish *Orconectes virillis*. *J Exp Biol.* 60:195-206.

- McMahon, B., Butler, P., Taylor, E., 1978. Acid–base changes during recovery from disturbance and during longterm hypoxic exposure in the lobster *Homarus vulgaris*. *Exp. Zool.* 205, 361–370.
- Mehrabian, Z., Liu, L., Fiskum, G., Rapoport, S., Chandrasekaran, K. 2005. Regulation of mitochondrial gene expression by energy demand in neural cells. *J. Neurochem.* 93:850-860.
- Meyuhas, O. 2000. Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *Eur J Biochem.* 267, 6321-6330.
- Morris, K., Gozal, D. 2004. Persistent respiratory changes following intermittent hypoxic stimulation in cats and human beings. *Resp Physiol Neurobiol* 140:1:8.
- Morris, S., Airriess, C. 1988. Integration of physiological responses of crustaceans to environmental challenge. *South Afr. J Zool.* 33, 87-106. ()
- Muhlia-Almazán, A., Martínez-Cruz, O., Ma. Navarrete del Toro, M., García-Carreño, F.; Arreola, R.; Sotelo-Mundo, R., Yepiz-Plascencia, G. 2008. Nuclear and mitochondrial subunits from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* F0F1 ATP-synthase complex: cDNA sequence, molecular modeling, and mRNA quantification of *atp9* and *atp6*. *J Bioenerg Biomembr.* 40:359–369.
- Müller, V., Lingl, A., Lewalter, K., Fritz, M. 2005. ATP synthase with novel rotor subunits: New insights into structure, function and evolution of ATPases. *J. Bioenerg. Biomembr.* 37:455-460.
- Pannunzio, T., Storey, K. 1998. Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*. *J Exp Mar Biol Ecol* 221:277-292.
- Pérez-Rostro, C., Racotta, I., Ibarra, A., 2004. Decreased genetic variation in metabolic variables of *Litopenaeus vannamei* shrimp after exposure to acute hypoxia. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 302:189–200.
- Pfeiffer, T., Schuster, S., Bonhoeffer, S. 2001. Cooperation and Competition in the Evolution of ATP-Producing Pathways. *Science.* 292:504-507.
- Poyton, R. McEwen, J. 1996. Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu. Rev Biochem* 65: 563-607.
- Rabalais, N., Turner, R. Wiseman, J. 2002. Gulf of Mexico hypoxia, a.k.a. “The dead zone.” *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 33:235–263.

- Racotta, I., Palácios, E.; Méndez, L. 2002. Metabolic responses to short and long-term exposure to hypoxia in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Mar. Fresh. Behav. Physiol.* 35:269–275.
- Ringwood, A., Keppler, C. 2002. Water quality variation and clam growth: Is pH really a non-issue in estuaries?. *Estuaries.* 25:901–907.
- Rissanen, E., Tranberg, K., Nikinmaa, M. 2006. Oxygen availability regulates metabolism and gene expression in trout hepatocyte cultures. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 291: R1507-R1515.
- Rosas, C., Martínez, E., Gaxiola, G., Brito, R., Sánchez, A., Soto, L. 1999. The effect of dissolved oxygen and salinity on oxygen consumption, ammonia excretion and osmotic pressure of *Penaeus setiferus* (Linnaeus) juveniles. *J of Exp Mar Biol Ecol.* 234: 141-57.
- Rosignol, R., Faustin, B., Rocher, C., Malgat, M., Mazat, J., Letellier, T. 2003 Mitochondrial threshold effects. *Biochem. J.* 370:751-762.
- Runswick, M., Walker, J. 1983. The amino acid sequence of the β -subunit of ATP synthase from bovine heart mitochondria. *J Biol Chem.* 258:3081-3089.
- Sambrook, J., Russell, D. 2001 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold. Spring Harbor Laboratory, USA.
- Schäfer, G., Engelhard, M., Müller, V. 1999. Bioenergetics of the Archaea. *Microbiol Mol Biol R.* 63: 570–620.
- Schapker, H., Breithaupt, T., Shuranovac, Z., Burmistrov, Y., Cooper, R., 2002. Heart and ventilatory measures in crayfish during environmental disturbances and social interactions. *Comp. Biochem. Physiol.* 131:397-407.
- Schirf, V., Turner, P., Selby, L., Hannapel, C., de la Cruz, P., Dehn, P. 1987. Nutritional status and energy metabolism of crayfish (*Procambarus clarkii*, Girard) muscle and hepatopancreas. *Comp Biochem Physiol A.* 88:383-6.
- Schnauffer, A., Clark-Walker, G., Alo, G., Steinberg, A., Stuart, K. 2005 The F1-ATP synthase complex in bloodstream stage trypanosomes has an unusual and essential function. *EMBO.* 24:4029–4040.
- Scholander, P. 1960. Oxygen Transport through Hemoglobin Solutions. *Science.* 131: 585-590.
- Seidman, E., Lawrence, A. 1985. Growth, feed digestibility, and proximate body composition of juvenile *Penaeus vannamei* and *Penaeus monodon* grown at different dissolved oxygen levels. *J. World Maricult. Soc.* 16:333-346.

- Shen, X., Ren, J., Cui, Z., Sha, Z., Wang, B., Xiang, J., Liu, B. 2007. The complete mitochondrial genomes of two common shrimps (*Litopenaeus vannamei* and *Fenneropenaeus chinensis*) and their phylogenomic considerations. *Gene*. 403:98-109.
- Sridharan, V., Guichard, J., Li, C., Muise-Helmericks, R., Beeson, C., Wright, G. 2008. O₂-sensing cascade: clamping of O₂ respiration, reduced ATP utilization, and inducible fumarate respiration. *Am J Physiol Cell Physiol* . 295:C29-C37.
- Stickle, W., Kapper, M., LI-Lian, L., Gnaiger, E., Wang, S. 1989. Metabolic Adaptations of Several Species of Crustaceans and Molluscs to Hypoxia: Tolerance and Microcalorimetric Studies. *Biol. Bull.* 177, 303-312.
- Stock, D., Leslie, A., Walker, J. 1999. Molecular architecture of rotary motor in ATP synthase. *Science*. 286:1700-1705.
- St-Pierre, J., Brand, M., Boutulier, R. 2000. The effect of metabolic depression on proton leak rate in mitochondria from hibernating frogs. *J Exp Biol*. 203:1469-1476.
- Taivassalo, T., Shoubridge, E., Chen, J., Kennaway, N., DiMauro, S., Arnol, D., Haller, R. 2001 Aerobic conditioning in patients with mitochondrial myopathies: physiological, biochemical, and genetic effects. *Ann Neurol*.50:133-141.
- Takeda, M., Chen, W., Saltzgaber, J., Douglas, M. 1986. Nuclear Genes Encoding the Yeast Mitochondrial ATPase Complex. *J Biol Biochem*. 281:15126-15133.
- Taylor, E., Butler, P. 1978. Aquatic and aerial respiration in the shore crab *Carcinus maenas* acclimated to 15°C. *J. Com. Physiol*. 127, 315-323.
- Tyler, R., Targett, T. 2007. Juvenile weakfish, *Cynoscion regalis*, distribution in relation to diel-cycling dissolved oxygen in an estuarine tributary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 333: 257-269.
- Tyson, R., Pearson, T. 1991. Modern and ancient continental shelf anoxia: an overview. *Geol. Soc. Spec. Pub* 58:1-24.
- Unsold, M., Marienfeld, J., Brandt, P., Brennicke, A. 1997. The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nat Genet*.15:57-61.
- Von Heijne, G. 1986. Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO J*. 5:1335:1342.
- Walker, J., Fearnley, I., Gay, N., Gibson, B., Northrop, F., Powell, S., Runswick, M., Saraste, M., Tybulewicz, V. 1985. Primary structure and subunit stoichiometry of F₁-ATPase from Bovine mitochondria. *J. Mol. Biol*. 184:677-701.

- Wallace, D. 2005. A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine. *Annu. Rev. Genet.* 39:359–407.
- Wallace, D., Ye, J., Neckelman, S., Singh, G., Webster, K., Greenberg, B. 1987. Sequence analysis of cDNAs for the human and bovine ATP synthase β subunit: mitochondrial DNA genes sustain seventeen times more mutations. *Curr Genet.* 12:81-90.
- Weber, J., Bowman, C., Wilke-Mounts, S., Senior, A. 1995. α -Aspartate 261 is a key residue in noncatalytic sites of *Escherichia coli* F-ATPase. *J. Biol. Chem.* 270:21045–49
- Webster, K. 2003. Evolution of the coordinate regulation of glycolytic enzyme genes by hypoxia. *J. Exp Biol.* 206: 2911-22.
- Wiesner, R., Hornung, T., Garman, J., Clayton, D., O’Gorman, E., Wallimann, T. 1999. Stimulation of Mitochondrial Gene Expression and Proliferation of Mitochondria Following Impairment of Cellular Energy Transfer by Inhibition of the Phosphocreatine Circuit in Rat Hearts. *J Bioenerg Biomembr.* 31:559-567.
- Wilkes, P., McMahon B., 1982b. Effect of maintained hypoxic exposure on the crayfish *Orconectes rusticus*. II. Modulation of haemocyanin oxygen affinity. *J. Exp. Biol.* 98:139–149.
- Wilkes, P., McMahon, B. 1982a. Effect of maintained hypoxic exposure on the crayfish *Orconectes rusticus*. I. Ventilatory, acid–base and cardiovascular adjustments. *J. Exp. Biol.* 98:119–137.
- Wilson, K., Cahill, K., Ballment, E., Benzie, J. 2000. The Complete Sequence of the Mitochondrial Genome of the Crustacean *Penaeus monodon*: Are Malacostracan Crustaceans More Closely Related to Insects than to Branchiopods?. *Mol. Biol. Evol.* 17:863–874.
- Wu, J., Chen, H. 2004. Effects of cadmium and zinc on oxygen consumption, ammonium excretion, and osmoregulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Chemosphere.* 57:1591-1598.
- Wu, R. 2002. Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. *Mar. Pollut. Bull.* 45: 35-45.
- Wu, R., Lam, P., Wan, K. 2002. Tolerance to, and avoidance of, hypoxia by the penaeid shrimp (*Metapenaeus ensis*). *Environ Pollut.* 118:351–355.
- Yagi, H., Tozawa, K., Sekino, N., Iwabuchi, T., Yoshida, M., Akutsu, H. 1999. Functional Conformation Changes in the TF_1 -ATPase β Subunit Probed by 12 Tyrosine Residues. *Biophys J.* 77:2175-2183.

- Young, R., Coyer, P. 1979. Phase co-ordination in the cardiac and ventilatory rhythms of the lobster *Homarus Americanus* J. Exp Biol. 82, 53.74.
- Zenteno-Savín, T., Soldiering, R; Ahuejote-Sandoval, M. 2006. Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp. Comp Biochem Phys C.142 :301–308.
- Zhang, P., Zhang, X., Li, J., Huang, G. 2006. The effects of body weight, temperature, salinity, pH, light intensity and feeding condition on lethal DO levels of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Aquaculture. 256:579–587.
- Zou, E., Du, N., Lai, W. 1996. The effects of severe hypoxia on lactate and glucose concentrations in the blood of the Chinese freshwater crab *Eriocheir sinensis* (Crustacea: Decapoda). Comp. Biochem. Physiol. 114A:105– 109.