

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**Evaluación de la expresión génica y caracterización
bioinformática de dos isoformas del translocador de
nucleótidos de adenina (ANT) en el camarón blanco**

Litopenaeus vannamei

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Erick Ricardo Armenta Castro

Hermosillo, Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de **Erick Ricardo Armenta Castro** la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de **Lic. En Químico Biólogo Clínico**.

Atentamente:



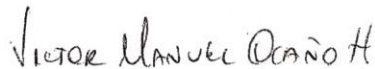
M.C. Chrystian Mariana Rodríguez Armenta
Presidente del jurado



Dr. Alonso Alexis López Zavala
Secretario



Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores
Vocal



Dr. Víctor Manuel Ocaño Higuera
Suplente

DEDICATORIA

A Dios por darme la fuerza de seguir adelante.

A mis papás Carlos y Norma, y mis hermanos Carlos, Paul y Daniela, por su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el apoyo proporcionado al proyecto 241670 de la Dra. Adriana Muhlia.

A mi directora de tesis, M.C. Chrystian Mariana Rodríguez Armenta por la paciencia y el apoyo tanto académico como personal durante mi estancia en CIAD.

A la Dra. Adriana Muhlia por abrirme las puertas de su laboratorio, ya que sin ella esto no hubiera sido posible.

A los miembros de mi comité: Dr. Alonso López, Dr. Aldo Arvizu y Dr. Víctor Ocaño, por su tiempo y dedicación al desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Enrique de la Re por brindarnos la facilidad de equipos de su laboratorio y por sus consejos en gran parte de la realización de este trabajo.

Al CIBNOR, pero en especial al Dr. Arturo Sánchez por facilitarnos las instalaciones y equipo de su laboratorio y al M.C. Fernando Mendoza por su apoyo en el diseño y realización del bioensayo.

Al Dr. Alejandro Varela por su asesoría en el análisis filogenético y M.C. Ofelia Méndez por su ayuda en la realización del mismo así como apoyo técnico.

Al Dr. Humberto González por su asesoría en los análisis estadísticos.

A la Q.B. Sandra Araujo por su apoyo técnico en el Laboratorio de Bioenergética y Genética Molecular.

A mis compañeros de laboratorio Cindy, Jesús, Kathia, Mariana, Martí, Ofelia, Orlando, que tiempo después unos se convirtieron en amigos.

A mis amigos de Los Mochis: Daniel, Fernando y Rossy, por su apoyo en la distancia.

A mis amigos Eva, Ibis, Jazmín, Jesús, Juan Manuel, Luis M., Luis R., Lupe, René y Samantha por ayudarme a sobrevivir en Hermosillo, entre mil cosas más.

A los Stars: Adriana, Eva, Juan Manuel, Lucía, Mara, Martí, Minerva y Rosa, por hacer más placentera la estancia universitaria.

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABLAS.....	ix
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
HIPÓTESIS	4
OBJETIVOS	5
Objetivo General	5
Objetivos Específicos	5
ANTECEDENTES.....	6
Generalidades del Camarón Blanco <i>Litopenaeus vannamei</i>	6
Ciclo de Vida de <i>Litopenaeus vannamei</i>	7
Vías de Síntesis de ATP	8
Mitocondria y su Estructura	10
Translocador de Nucleótidos de Adenina	12
Estructura y Función	12
Estudios del Translocador de Nucleótidos de Adenina en Crustáceos	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
Bioensayo	18
Extracción de ARN Total de Músculo de Camarón.....	19
Cuantificación y Evaluación de la Integridad del ARN Total	20
Eliminación del ADN Genómico Contaminante en el ARN Total.....	20
Síntesis de ADN Complementario la Evaluación de la Expresión Génica.....	21
Diseño de Oligonucleótidos y Evaluación de la Expresión Génica de ANT en el Músculo de <i>Litopenaeus vannamei</i>	22

Obtención de Mitocondrias de Músculo del <i>Litopenaeus vannamei</i>	23
Cuantificación de Proteína Mitocondrial en el Músculo del Camarón Blanco.....	24
Cuantificación de ATP en Mitocondrias del Músculo de <i>Litopenaeus vannamei</i>	24
Modelación in silico de las Isoformas LvANTX y LvANT2 de <i>Litopenaeus vannamei</i>	25
Análisis Filogenético de LvANTX y LvANT2 del Camarón Blanco <i>L. vannamei</i>	25
Análisis Estadístico	26
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	27
Comparación de las Secuencias de Nucleótidos y Deducida de Aminoácidos de LvANTX y LvANT2.....	27
Integridad del ARN Total y Ausencia de ADNg Contaminante.....	32
Evaluación de la Síntesis del ADN complementario	33
Efecto del Ejercicio Prolongado en la Expresión Génica de ANT del Camarón Blanco	34
Extracción de Mitocondrias y Cuantificación de Proteína Mitocondrial	39
Cuantificación del ATP Mitocondrial	40
Modelación in silico de LvANTX y LvANT2 de <i>Litopenaeus vannamei</i>	43
Relaciones Filogenéticas de las isoformas de ANT en <i>L. vannamei</i>	49
CONCLUSIONES	54
RECOMENDACIONES	55
BIBLIOGRAFÍA.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Anatomía del camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i>	6
2. Ciclo de vida del camarón blanco	8
3. Cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa	10
4. Estructura de la mitocondria	11
5. Estructura cristalográfica de ANT1 de bovino	13
6. Función del translocador de nucleótidos de adenina (ANT)	14
7. Inducción de cambio conformacional de abierto a cerrado de ANT	14
8. Modelos del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPM)	16
9. Alineamiento de secuencias nucleotídicas de <i>LvANTX</i> y <i>LvANT2</i>	29
10. Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas	31
11. Análisis de integridad de ARN total	32
12. Análisis de la eliminación de ADNg	33
13. Análisis de productos de PCR de la síntesis de ADNc	34
14. Análisis de expresión de <i>LvANTX</i> , <i>LvANT2</i> y L8	35
15. Expresión génica de <i>LvANTX</i>	37
16. Expresión génica de <i>LvANT2</i>	37
17. Expresión de isoformas de <i>LvANT</i>	38
18. Cuantificación de ATP mitocondrial por tratamiento	41
19. Comparación de modelos proteicos predictivos de <i>LvANTX</i> y <i>LvANT2</i> (1)	45
20. Comparación de modelos proteicos predictivos de <i>LvANTX</i> y <i>LvANT2</i> (2)	46
21. Alineamiento de las estructuras proteicas predictivas de <i>LvANTX</i> y <i>LvANT2</i>	47
22. Alineamiento de estructuras proteicas de <i>LvANT</i> con ANT1 de bovino y crustáceos	48
23. Árbol filogenético de la proteína mitocondrial ANT	53

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Condiciones del bioensayo de ejercitación de los camarones	19
2.	Promedio de las concentraciones de la proteína mitocondrial en músculo del Camarón	40
3.	Comparación de la secuencia de aminoácidos de <i>LvANTX</i> y otras especies	51
4.	Comparación de la secuencia de aminoácidos de <i>LvANT2</i> y otras especies	52

RESUMEN

El camarón blanco *Litopenaeus vannamei* es un crustáceo que tiene gran importancia económica a nivel mundial por su alta tasa de consumo alimenticio. A pesar de esto, su biología se ha estudiado poco y es necesario realizar investigaciones al respecto para su futura preservación. En su ciclo de vida se enfrenta a diferentes condiciones como la migración desde el mar abierto hacia los esteros. La migración requiere grandes cantidades de energía, misma que la célula obtiene en forma de ATP (trifosfato de adenosina), mayormente proporcionada por la mitocondria, el cual es objeto de estudio de la bioenergética. El ADP (difosfato de adenosina) y el ATP es translocado desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana mediante el translocador de nucleótidos de adenina (ANT), mediante cambios conformacionales en la proteína, para abastecer los requerimientos energéticos de la célula. En el presente trabajo se estudiaron dos isoformas de ANT presentes en las mitocondrias de *L. vannamei* (*LvANTX* y *LvANT2*). Se evaluó la expresión génica de ANT en el músculo del camarón mediante métodos semi-cuantitativos, cuando los organismos se ejercitaron prolongadamente y se encontraban en ayuno, además se evaluó la cantidad de ATP mitocondrial. De igual forma se hizo un análisis bioinformático para establecer las características estructurales de las isoformas proteicas mediante modelos predictivos, así como también se establecieron las relaciones filogenéticas de ANT de camarón con las de otras especies. Se encontró que la expresión de las isoformas *LvANTX* y *LvANT2* en el músculo de *L. vannamei*, se modifica conforme aumenta el tiempo de ejercicio. Por los niveles de expresión que presentan cada isoforma de *LvANT* en este trabajo se sugiere que *LvANTX* se encarga de exportar el ATP desde la mitocondria hacia la célula, mientras que la isoforma *LvANT2* lo conduce al interior de este organelo, bajo estas condiciones de ejercicio y ayuno. Por otro lado, los modelos estructurales predictivos de ambas isoformas de ANT, presentan características estructurales muy similares entre ellas y al comparar las proteínas de distintas y analizar sus relaciones filogenéticas, se sugiere que está altamente conservada debido a la gran importancia que tiene en el metabolismo celular.

INTRODUCCIÓN

El camarón blanco *Litopenaeus vannamei* es un crustáceo decápodo marino de gran importancia económica, debido a que es una de las especies más cultivadas en el mundo como recurso alimenticio, ya que se generaron 1.3 millones de toneladas métricas únicamente en el año 2000, y el 11% fueron cultivados en el continente americano (Puente, 2009). En México, el estado de Sonora es uno de los principales productores de camarón (Gucic, 2008, Puente, 2009). Durante su ciclo de vida, el camarón se ve expuesto a diversas condiciones ambientales como cambios de temperatura, salinidad y disponibilidad de oxígeno disuelto en agua; por lo que los organismos han desarrollado estrategias de adaptación para sobrevivir a dichas condiciones (Muhlía-Almazan y Garcia-Carreno, 2003).

Los camarones son nadadores fuertes en especial durante la etapa larvaria, estrategia que les permite recorrer grandes distancias para migrar y lograr la supervivencia (Epifanio y Cohen, 2016). La migración conlleva una alta demanda energética, por lo que el organismo desarrolla una capacidad para generar energía en forma de ATP y almacenarla de manera muy eficiente (Laverack, 1962; da Rosa y col., 2016). Si bien la célula eucariota cuenta con diferentes mecanismos para la producción de energía en forma de ATP, el 90 % es producido dentro de la mitocondria (Alberts y col., 2008).

La mitocondria es un organelo que se encuentra dentro de la célula eucariota y está conformado por una membrana externa y otra membrana interna separadas por un espacio intermembrana; en el interior de la membrana interna se localiza la matriz mitocondrial (Lehninger y col., 2000). En la membrana interna mitocondrial (MIM) se llevan a cabo procesos metabólicos como la síntesis de ATP, que implica el acoplamiento de la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa. Además, en la MIM se encuentran diferentes proteínas transmembrana que se encargan del transporte de moléculas desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, entre las cuales está el translocador de nucleótidos de adenina (ANT, por sus siglas en inglés) (Nicholls y Ferguson, 2013). ANT, al igual que los demás translocadores mitocondriales, es específico en cuanto a los metabolitos que transporta, y la función de esta proteína es introducir ADP a la matriz mitocondrial y translocar ATP hacia el espacio intermembrana para el abastecimiento energético (Halestrap y Brenner, 2003; Arboleda, 2008; Romano y col., 2016).

Se han reportado cuatro isoformas proteicas de ANT en las mitocondrias de humano, y cada una es codificada por un gen diferente, expresándose de manera diferencial (Doerner

y col., 1997, Gavalda-Navarro y col., 2014). Sin embargo, en el camarón blanco hasta la fecha sólo se han sido reportadas dos secuencias completas del transcrito de ARN mensajero (ARNm), que se expresan de manera ubicua (Yin y col., 2012; Ma y col., 2014).

Si bien el ANT es un translocador que juega un papel sumamente importante en la célula eucariota, al conferir parte de la funcionalidad a la mitocondria, esta proteína se ha estudiado poco en el camarón blanco. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó la expresión génica de ANT cuando el camarón se encuentra en un periodo de gran demanda energética, como es el ejercicio prolongado, además de la relación que hay entre la expresión del gen y las concentraciones de ATP mitocondrial. Además, se hizo un análisis estructural basado en modelos predictivos de la proteína y se establecieron las relaciones filogenéticas de ANT del camarón con la proteína de otras especies.

HIPÓTESIS

Los transcritos de las dos isoformas del translocador de nucleótidos de adenina *LvANT1* y *LvANT2*, que son estructuralmente diferentes, se expresan diferencialmente bajo condiciones de ejercicio continuo y prolongado en el músculo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, afectando los niveles de ATP plasmático y mitocondrial.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la expresión de los transcritos de dos isoformas de ANT y cuantificar la concentración de ATP mitocondrial de *Litopenaeus vannamei* bajo condiciones de ejercicio constante y ayuno, caracterizar la estructura predictiva de la proteína y establecer sus relaciones filogenéticas.

Objetivos Específicos

1. Cuantificar los cambios de expresión génica de las isoformas *LvANTX* y *LvANT2* en respuesta al ejercicio mediante métodos semicuantitativos.
2. Cuantificar los niveles de ATP en mitocondrias aisladas de músculo del camarón blanco.
3. Establecer modelos proteicos predictivos de ambas isoformas de ANT del camarón blanco mediante herramientas bioinformáticas.
4. Analizar las relaciones filogenéticas de la secuencia proteína de las dos isoformas de ANT del camarón blanco, con la de otras especies.

ANTECEDENTES

Generalidades del Camarón Blanco *Litopenaeus vannamei*

Los camarones son un grupo de crustáceos pertenecientes al orden *Decapoda*; se estima que existen alrededor de 2,500 especies con una gran diversidad en cuanto a tamaño y características fenotípicas. Los organismos pertenecientes a este grupo se caracterizan por tener un cuerpo dividido en regiones como el cefalotórax, donde se encuentran órganos como hepatopáncreas, corazón, branquias, y pedúnculos oculares). La región del abdomen incluye músculo, pleópodos y prolongaciones del sistema nervioso e intestino, mientras que el telson es el último segmento después del abdomen o apéndice terminal (Farfante, 1988) (Figura 1).

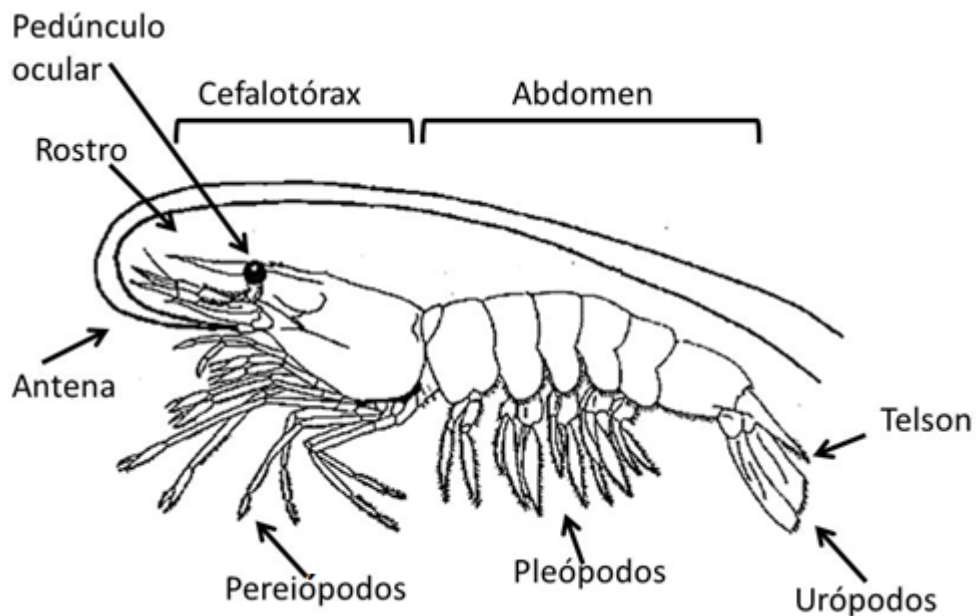


Figura 1. Anatomía del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

Dentro del orden *Decapoda* se encuentra la Familia *Penaeoidea*, a la cual pertenece *Litopenaeus vannamei*, también conocido como camarón blanco o del Pacífico. Este se encuentra distribuido principalmente desde las costas del Golfo de California en México,

hasta las costas de Perú; lo que coloca a los países de Estados Unidos de América, México, Centroamérica y Sudamérica como los principales cultivadores de camarón blanco. Aunque también otros países como China, India, Indonesia, Tailandia y Taiwán realizan esta importante actividad (Fofonoff y col., 2003).

Ciclo de Vida de *Litopenaeus vannamei*

El camarón blanco *L. vannamei* sufre múltiples metamorfosis durante su ciclo de vida lo que le permite pasar de una etapa de crecimiento a otra, destacándose seis fases: embrionaria, larval, juvenil, adolescente, pre-adulta y adulta (Figura 2). La etapa embrionaria se refiere a los huevos depositados por los adultos en el mar abierto. En la fase larval se presentan tres estadios: nauplios, que se alimentan de los restos del saco vitelino, son fototácticos y nadan intermitentemente en mar abierto, mientras que en las etapas de zoea y mysis se alimentan de fitoplancton, zooplancton y materia orgánica, y nadan intermitentemente (Rivera, 1998).

La migración comienza en la fase de postlarvas para el desarrollo de su etapa juvenil, en donde los organismos se dirigen hacia los esteros gracias a su gran capacidad y resistencia natatoria así como a las corrientes mareales. Al concluirse la etapa juvenil en esteros, hay una migración hacia el mar abierto en donde los camarones se desarrollan a la etapa adulta, para continuar con el ciclo de vida (Figura 2) (Castille y col., 1993). Por lo anterior, se reconoce a los camarones por ser nadadores fuertes, permitiendo así su supervivencia (Epifanio y Cohen, 2016).

Durante la migración se requiere un alto gasto energético, por lo que el organismo desarrolla respuestas fisiológicas que le permitirán incrementar la concentración de ATP intracelular para seguir activo (Bangsbo y col., 2001). Mecanismos como la glucólisis, hidrólisis de fosfágenos en el citosol, o mediante la fosforilación oxidativa dentro de la mitocondria, son algunas de las formas en que se puede lograr el aumento de la síntesis del ATP intracelular, mismo que se verá reflejado en un incremento de los niveles de ATP plasmático (Hill y col., 2004).

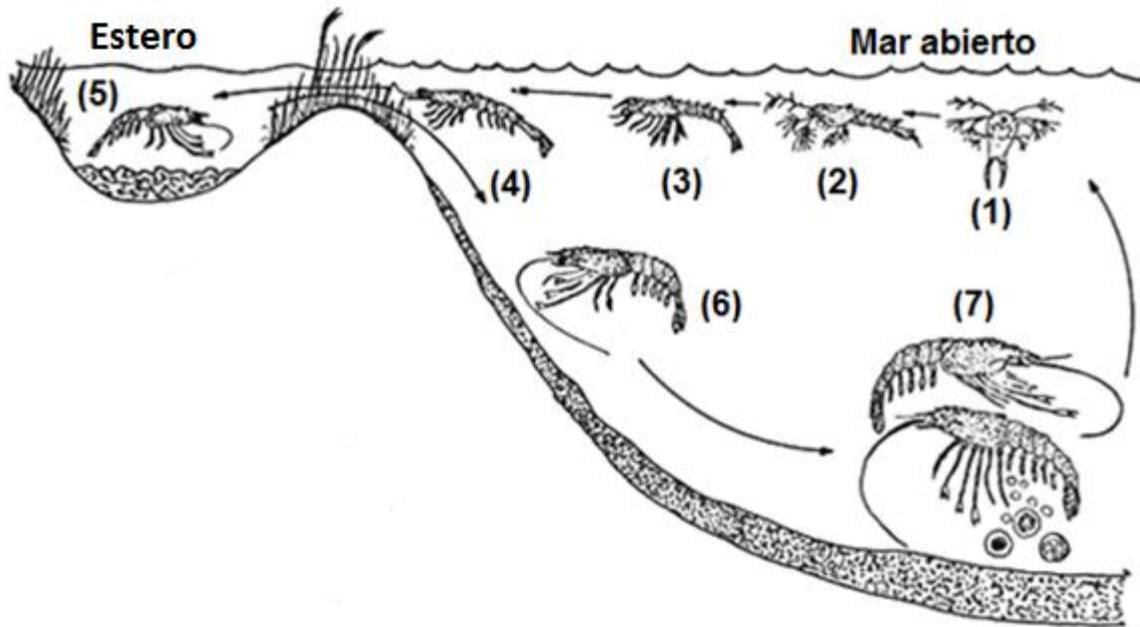


Figura 2. Ciclo de vida del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. 1) Nauplios, 2) Zoea, 3) Mysis, 4) Postlarva, 5) Juvenil, 6) Preadulto, 7) Adulto. Modificado de Boschi (1997).

Vías de Síntesis de ATP

El trifosfato de adenosina (ATP, por sus siglas en inglés) es la molécula que los seres vivos utilizan como energía para realizar un trabajo. Esta molécula juega un papel importante en diferentes funciones del metabolismo de la célula, por ejemplo, como efector alostérico de vías metabólicas, mensajero celular, reacciones de fosforilación, transporte activo, plegamiento de proteínas, gradientes iónicos, contracción muscular, entre otros (Madrigal y col., 2010). La célula eucariota cuenta con diferentes vías para la síntesis del ATP, como lo son la glucólisis, hidrólisis de fosfágenos y la fosforilación oxidativa (Lehninger y col., 2000; Hill y col., 2004).

La glucólisis se lleva a cabo en el citosol y es una ruta metabólica de diez pasos que se encarga de la oxidación de la glucosa para la generación de ATP. Esta a su vez se divide en dos fases: en la primera fase se utiliza el ATP para la fosforilación de la glucosa y también se da la división de la hexosa en dos moléculas de triosa-fosfato. En la segunda fase se generan dos moléculas de NADH, cuatro moléculas de ATP y dos moléculas de piruvato.

Dependiendo de la disponibilidad de oxígeno la glucólisis puede suceder de manera aerobia, en la cual el piruvato se dirige al ciclo de Krebs dentro de la mitocondria, o anaerobia en donde el piruvato se reduce a lactato en el citosol (Lehninger y col., 2000, Voet y Voet, 2006).

Por otro lado, la célula cuenta con otro sistema para obtener energía de manera más rápida durante el ejercicio anaerobio y de alta intensidad, este es la hidrólisis de fosfágenos que ocurre en tejido muscular. Los fosfágenos son moléculas de fosfato de alta energía, como la fosfocreatina, que junto con el difosfato de adenosina (ADP, por sus siglas en inglés) se sintetiza ATP mediante la enzima creatina cinasa (Hill y col., 2004). Dentro del mismo sistema, ocurre otra reacción importante que es catalizada por la enzima miocinasa, la cual forma ATP y AMP a partir de dos moléculas de ADP (Baechle y Earle, 2007). Específicamente los crustáceos cuentan con la enzima arginina cinasa que es la que se encarga de realizar la hidrólisis de fosfágenos, a partir de fosfoarginina (García-Orozco y col., 2007).

Si bien la célula tiene mecanismos dentro del citosol para la generación de ATP, la mitocondria es el principal productor de esta molécula ya que en condiciones aerobias el piruvato que entra al ciclo de Krebs es utilizado para la generación de compuestos reducidos como el NADH y FADH₂, mismos que serán oxidados por la cadena de transporte de electrones (CTE). La CTE consta de cuatro complejos multiméricos (complejo I, II, III y IV) que permiten el paso de los electrones a través de ellos, permitiendo la reducción del oxígeno a agua mediante el complejo IV. Además la CTE genera la fuerza protón motriz que será utilizada por el complejo V o ATP sintasa, para la síntesis del ATP, proceso que se conoce como fosforilación oxidativa (Figura 3) (Nicholls y Ferguson, 2013). Mediante estos mecanismos, la mitocondria aporta del 90 al 95 % de la energía en forma de ATP que la célula necesita para realizar sus funciones (Arboleda, 2008).

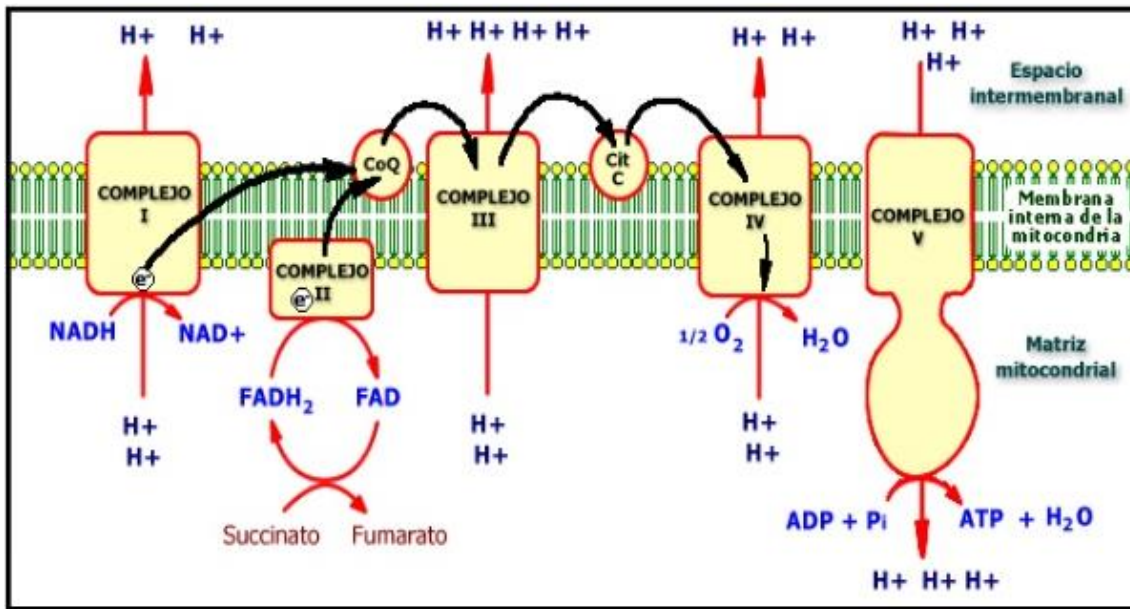


Figura 3. Cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa. Complejo I: NADH deshidrogenasa, II: Succinato deshidrogenasa, III: Citocromo C reductasa, IV: Citocromo C oxidasa, V: ATP sintasa, CoQ: Ubiquinona, Cit C: Citocromo C (Anónimo).

Mitocondria y su Estructura

La mitocondria es un organelo que se encuentra dentro de la célula eucariota y se encarga de realizar múltiples funciones metabólicas, como el metabolismo lipídico, la respiración celular y la síntesis de ATP (Alberts y col., 2008). La estructura de la mitocondria está conformada por una membrana externa y una interna, separadas por un espacio intermembrana, y dentro de la membrana interna se encuentra la matriz mitocondrial (figura 4). Dentro de la matriz se encuentra ADN mitocondrial, ribosomas, y un gran número de complejos enzimáticos que llevan a cabo parte del metabolismo celular. La membrana externa mitocondrial (MEM) permite el paso de iones y moléculas menores a 6 kDa desde el citoplasma al espacio intermembrana y viceversa, a través de proteínas de tipo porinas y el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC, por sus siglas en inglés) (Shoshan-Barmatz y col., 2010).

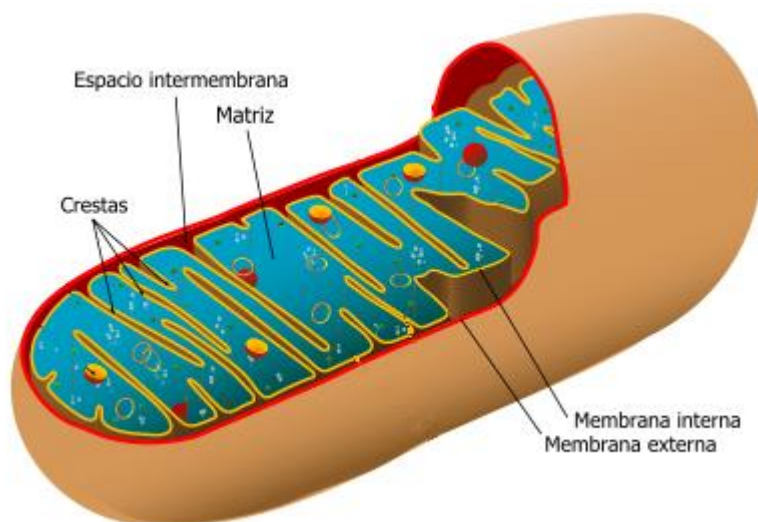


Figura 4. Estructura de la mitocondria (Anónimo).

Por otra parte, en la membrana interna mitocondrial (MIM) se llevan a cabo procesos metabólicos como la síntesis de ATP mediante el acoplamiento de la cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa (Alberts y col., 2008). Además la MIM es muy selectiva en cuanto a las moléculas que pueden atravesarla, ya cuenta con diversas proteínas transmembrana que se encargan del transporte específico de moléculas desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana y viceversa, permitiendo así la generación y mantenimiento del potencial electroquímico para la síntesis del ATP (Nicholls y Ferguson, 2013).

La selectividad de la MIM está dada gracias a las proteínas translocadoras ubicadas en ella, y una de las principales familias es la SLC25A. La familia SLC25A comprende proteínas transportadoras, translocadoras y acarreadoras que presentan cuatro características principales (Robinson y col., 2008). Estas proteínas tienen un peso molecular de 30 a 40 kDa y su estructura está conformada por seis hélices alfa transmembranales y tres hélices alfa hidrofóbicas, además presentan tres motivos **PX[D/E]XX[R/K]** y **[Y/F][D/E]XX[K/R]** repetidos (Nicholls y Ferguson, 2013). Dentro de esta familia se encuentran proteínas como el acarreador de glutamato, dicarboxilato, 2-oxoglutarato, que permiten el paso de moléculas que participan en el ciclo de Krebs (Goubert y col., 2017), acilcarnitina/carnitina que participa en el metabolismo lipídico (McKee y col., 2003), así como el translocador de nucleótidos de adenina (ANT, por sus siglas en inglés), que tiene especial

importancia, ya que a través de este se transloca el ADP/ATP a través de la MIM, para la síntesis del ATP y liberación del mismo al citosol (Halestrap y Brenner, 2003).

Translocador de Nucleótidos de Adenina

Estructura y Función

El translocador de nucleótidos de adenina (ANT) es una de las proteínas mitocondriales más abundantes (Krämer, 1996). Esta se codifica en el genoma nuclear y la proteína está conformada por 100 aminoácidos con una masa molecular de 32 kDa aproximadamente en mamíferos. Estructuralmente está constituida por seis subunidades transmembrana que se unen mediante giros de aminoácidos hidrofílicos tanto en el espacio intermembrana como en la matriz mitocondrial, con los extremos amino y carboxilo terminal situados en el espacio intermembrana. Por otra parte, aminoácidos como lisina y arginina (K22, R79, R187, R235, R236 y R279 en ANT1 de *B. taurus*) forman parte de los residuos de unión a nucleótidos de este translocador. De igual forma, muestran la firma característica **RRRMMM** (Figura 5) (Hoffmann y col., 1994).

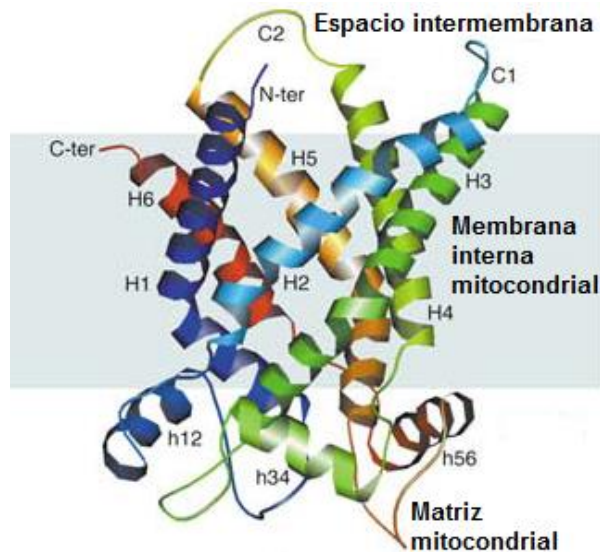


Figura 5. Estructura cristalográfica de ANT1 de bovino (PDB: 1OKC). Modificado de Pebay-Peyroula y col. (2003).

La función de ANT es permitir el paso del ADP desde el espacio intermembrana hacia la matriz mitocondrial en donde se fosforila para la síntesis de ATP mediante la ATP sintasa en la célula eucariota (Halestrap y Brenner, 2003; Arboleda, 2008; Romano y col., 2016) (figura 6). Para lograr la translocación es necesario que el ANT lleva a cabo cambios conformacionales para tener sitios de unión al ADP o ATP (Doerner y col., 1997). La conformación “m” permite que el sitio de unión al substrato se encuentre abierto en la cara interna de la MIM (hacia la matriz mitocondrial); mientras que la conformación “c” se encuentra abierto en la cara externa de la MIM (hacia el espacio intermembrana), de tal manera podrá recibir los nucleótidos de adenina desde el citoplasma o la matriz mitocondrial (Figura 7) (Nicholls y Ferguson, 2013).

Las conformaciones “m” y “c” también pueden ser inducidas por moléculas que actúan como inhibidores de ANT. El ácido bongkrécico (BKA) induce un cambio conformacional “m” (Halestrap y Brenner, 2003; Pebay-Peyroula y col., 2003), mientras que el atractilósido (ATR) y carboxiatractilósido (CAT) son inductores del cambio conformacional “c” de la proteína (Figura 7) (Anwar y col., 2017). Estos tres inhibidores bloquean el paso de ATP y ADP de manera irreversible, teniendo consecuencias en la función de ANT y, por lo

tanto, en el abastecimiento energético de la célula (Halestrap y Brenner, 2003; Nicholls y Ferguson, 2013).

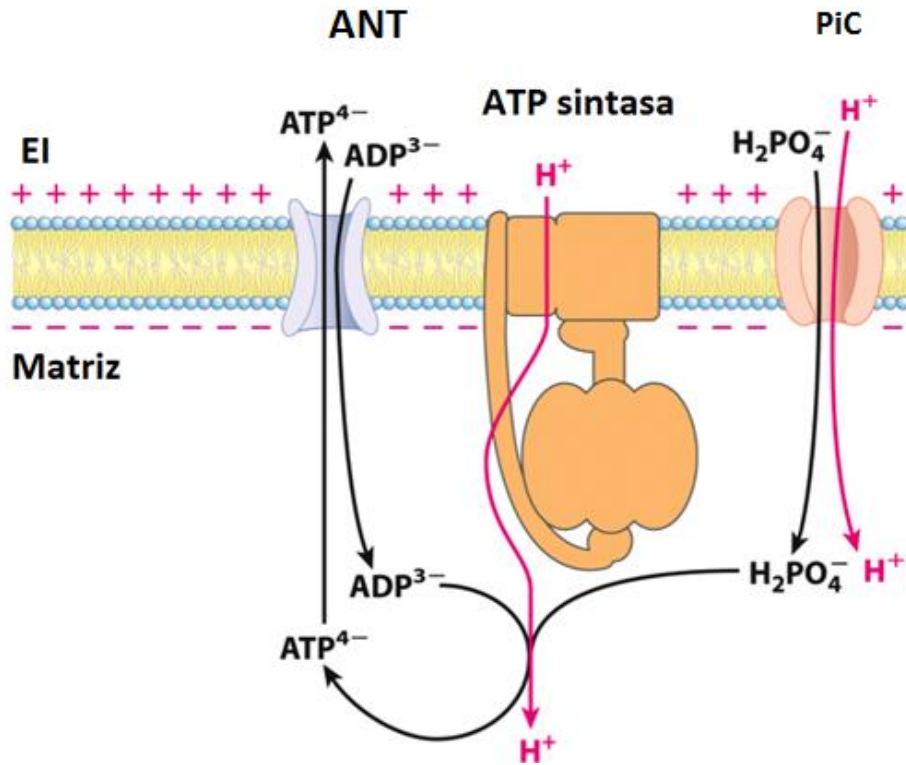


Figura 6. Función del translocador de nucleótidos de adenina (ANT) en sincronía con la ATP sintasa y el acarreador de fosfatos (PiC) (Anónimo, 2013).

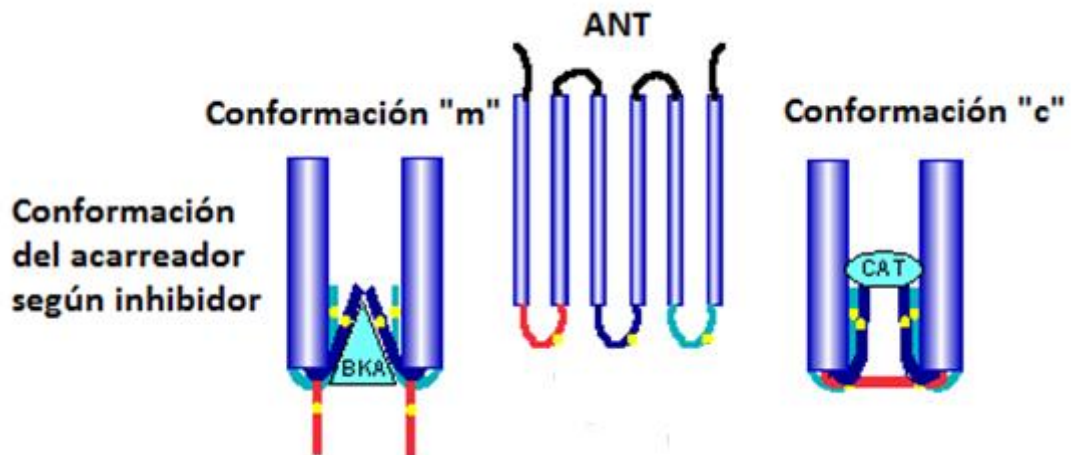


Figura 7. Inducción de cambio conformacional de abierto a cerrado de ANT. BKA: ácido bongkrécico, CAT: carboxiatractilósido. Modificado de Halestrap y Brenner (2003).

Además de la función translocadora de ANT, diversos estudios han sugerido que esta proteína forma parte del poro de la transición de la membrana interna mitocondrial (PTPM), que es un complejo proteico que participa durante el fenómeno de la transición de permeabilidad (TP) (Halestrap y col., 1998, Hunter y Haworth, 1979). La TP se define como el incremento de la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial, permitiendo el paso no-selectivo de moléculas menores a 1.5 kDa desde la mitocondria hacia el citosol (Hunter y Haworth, 1979; Haworth y Hunter, 2000). Este fenómeno se ha asociado a procesos de muerte celular por necrosis (Crompton, 1999) y se activa en vertebrados, principalmente bajo condiciones de estrés oxidativo y altas concentraciones de calcio (Ca^{2+}) y fosfatos (PO_4^{3-}) (Panov y col., 2004).

Se han propuesto diversos modelos sobre la estructura y formación del PTPM sugiriendo que se integra por múltiples proteínas. Uno de los primeros modelos en donde se propuso la participación de ANT como parte del PTPM, fue propuesto por Crompton y col. (1998), en donde sugieren que interaccionan el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) que se localiza en la membrana externa mitocondrial, ciclofilina D (CyP-D) que se encuentra en la matriz mitocondria, y el ANT (Figura 8a) (Szabó y Zoratti, 1993). Este modelo propone que cuando CyP-D no se encuentra inhibida por CsA (Ciclosporina A), cataliza un cambio conformacional en ANT permitiendo que esta pueda unirse a VDAC, para así formar el PTPM (Crompton y col., 1998).

Otro modelo es el propuesto por Chen y col. (2004) en donde la formación del PTPM se da mediante el ATP sintasoma mitocondrial. Este complejo está conformado por la ATP sintasa en su forma monomérica, el acarreador de fosfatos (PiC), ambas proteínas localizadas en la MIM y el ANT (figura 8b). El mecanismo sugerido propone que el complejo ATP sintasoma actúa como un canal no selectivo para el paso de metabolitos pudiéndose dar la transición de la permeabilidad a través de él (Ko y col., 2003; Chen y col., 2004; Leung y col., 2008; Leung y Halestrap, 2008; Gutiérrez-Aguilar y col., 2010).

Los estudios anteriores reportaron que el ANT es una molécula de suma importancia para la formación del PTPM y la TP. Sin embargo, existen reportes en los cuales silenciaron el gen que codifica para ANT y observaron que la TP se sigue presentando, evidenciando que el ANT no es esencial para formación del PTPM (Kokoszka y col., 2004). Si bien se han realizado múltiples trabajos en donde se estudia la estructura del poro de la transición de la permeabilidad, esta no ha sido elucidada a la fecha, por lo que diversos grupos de

investigación siguen trabajando en el estudio de las moléculas que pueden formar parte del PTPM.

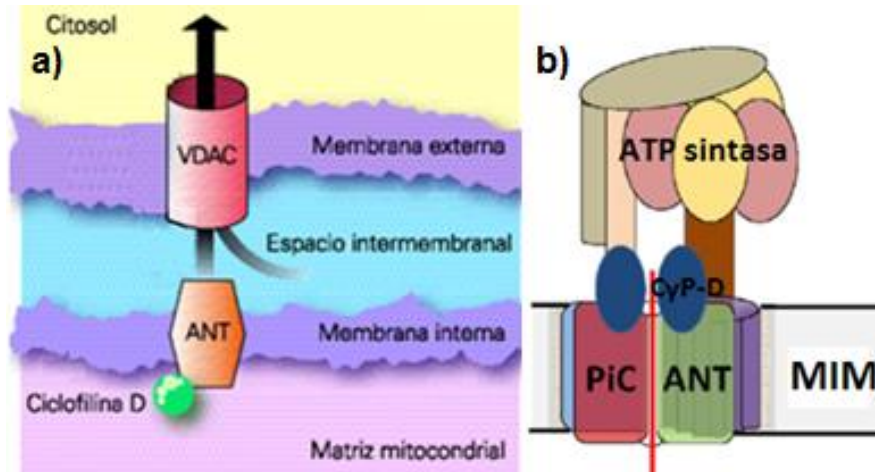


Figura 8. a) Modelo del PTPM mediante la interacción de VDAC, ANT y CyP-D, modificado de Crompton (1999); b) Modelo del PTPM por complejo ATP sintasoma. Modificado de Halestrap (2014).

A la fecha, en el humano se han reportado cuatro isoformas proteicas de ANT, cada una codificada por un gen diferente, las cuales se expresan de manera diferencial. La isoforma ANT1 se expresa en células de fibras musculares oxidativas, como las del corazón, mientras que ANT2 se expresa en células que se encuentran en proliferación, siendo más baja su expresión en células oxidativas (Barath y col., 1999). La isoforma ANT3 se expresa de manera ubicua y ANT4 se expresa específicamente en el tejido testicular. (Doerner y col., 1997, Gavaldà-Navarro y col., 2014). De manera similar, en los tejidos de ratón se han identificado 3 isoformas de ANT, que al igual que en el humano se expresan de manera tejido-específica: ANT1 se expresa en el corazón y músculo, ANT2 en células proliferativas y ANT4 en testículos (Dorner y col., 1999; Levy y col., 2000; Rodic y col., 2005).

Si bien no hay reportes en los cuales se relacione directamente la expresión del translocador de nucleótidos de adenina con el ejercicio, si se conoce que la expresión de los genes cuya proteína tiene una función mitocondrial se expresan de manera tardía durante el

ejercicio, mientras que la proteína codificada se mantiene activa en el tejido por más tiempo (Booth y Neuffer (2005).

Estudios del Translocador de Nucleótidos de Adenina en Crustáceos

La funcionalidad de ANT es de gran importancia para que la célula funcione adecuadamente, sin embargo esta proteína ha sido escasamente estudiada en crustáceos. Una investigación realizada en el braquiópodo *Artemia franciscana* reportó la presencia de la proteína de ANT junto con VDAC y CyP-D en las mitocondrias aisladas de este organismo, mediante la técnica de western blot (Menze y col., 2005). Por otro lado en estudios realizados en *A. franciscana* y los camarones *Crangon crangon* y *Palaemon serratus*, se observó que la actividad de ANT se inhibió con el BKA en los camarones al igual que ocurre en mamíferos, mientras que en *A. franciscana* la actividad no fue inhibida (Konrad y col., 2011, Konrad y col., 2012).

Específicamente en el camarón blanco *L. vannamei* se han realizado estudios en donde se reporta la secuencia nucleotídica de la isoforma ANT2, y además observaron que la expresión del transcrito de esta isoforma se da en tejidos como corazón, hepatopáncreas, músculo, estómago, intestino y pedúnculo ocular. También se determinó por RT-qPCR, que la expresión del ARN mensajero (ARNm) de ANT2 es mayor en músculo cuando el camarón fue expuesto a bajas temperaturas (Yin y col. 2012).

Por otro lado, Ma y col. (2014) reportaron la secuencia del transcrito de otra isoforma de ANT, e hicieron la evaluación de la expresión del transcrito cuando el camarón fue expuesto al virus de la mancha blanca (WSSV). Se observó que la expresión de esta isoforma ocurre en hemocitos, branquias, músculo, hepatopáncreas, estómago e intestino. Además, mediante técnicas de inmunoprecipitación, los autores observaron que ANT interacciona con la proteína VP12 de la cápside viral, sugiriendo que al unirse estas dos proteínas facilitan la formación de un canal que modula la permeabilización de la membrana mitocondrial (Ma y col., 2014) inducen la apoptosis celular permitiendo la liberación de los viriones y la progresión de la infección (Yoshida, 2001; Leu y col., 2013).

MATERIALES Y MÉTODOS

Bioensayo

Para evaluar el efecto del ejercicio sobre la expresión génica de ANT en el músculo del camarón, se aclimataron 30 camarones juveniles de aproximadamente 10 g de peso en estadio de intermuda, durante cinco días en el laboratorio húmedo del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR, unidad Hermosillo, Sonora). La aclimatación se llevó a cabo en dos tinas circulares con capacidad de 80 L (control y experimental), en donde se colocaron 15 camarones en cada tina con 60 L de agua marina con salinidad de 35 ppm y 29°C de temperatura. La aireación del agua fue constante para mantener los niveles de oxígeno disuelto (OD) por encima de 4 mg/L, así mismo los organismos fueron alimentados a saciedad con pellet comercial diariamente y el agua fue sifoneada de manera periódica.

Después de la aclimatación, se hicieron muestreos como se indica en la Tabla 1. En el tiempo 0 (T0), se tomaron 3 camarones de cada tina, estos fueron pesados, y después se disectó el músculo de cada organismo y se colocó en tubos cónicos de 15 mL congelándolos inmediatamente a -80°C para su posterior uso.

Los camarones restantes de la tina control se continuaron alimentando, mientras que los camarones de la tina experimental se pusieron en ayuno durante 48 h. Transcurrido este tiempo, se muestrearon tres camarones en ambas tinas (tiempo T1), para disectar el músculo de cada organismo. Seguido a esto, en la tina experimental se colocó una bomba sumergible Aquajet 20F con capacidad de bombear 1050 L/h, para generar una corriente dentro de la tina y obligar a nadar a los camarones contra corriente para ejercitarse, además de que estos se encuentran en ayuno constante. Se realizaron tres muestreos posteriores de tres camarones tanto de la tina control (sin ayuno, ni ejercicio), como de la experimental, para obtener músculo a las 6 h (T2), 12 h (T3) y 16 h (T4) post-ejercicio (Tabla 1). El músculo disectado se almacenó a -80°C en un ultracongelador HERA FREEZE-HFUB SERIES de Thermo SCIENTIFIC hasta su utilización en las instalaciones del Laboratorio de Bioenergética y Genética Molecular del Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, unidad Hermosillo, Sonora).

Tabla 1. Condiciones del bioensayo de ejercitación de los camarones *L. vannamei*

Muestreo	Tina control	Tina experimental	
		Ayuno	Ejercicio
T0		0 h	0 h
T1	Sin ayuno Sin ejercicio	48 h	0 h
T2		54 h	6 h
T3		60 h	12 h
T4		64 h	16 h

Extracción de ARN Total de Músculo de Camarón

Para evaluar la expresión génica de ANT bajo las condiciones de ejercicio, se extrajo el ARN total del músculo disectado de los camarones muestreados por cada tratamiento. Se utilizó el reactivo TRIzol® Plus RNA purification kit (Invitrogen, USA), que inactiva las ribonucleasas (RNasas) y permite mantener el ARN íntegro durante la homogenización, siguiendo las instrucciones de manufactura (Chomczynski y Sacchi, 1987). En un microtubo se homogenizaron 100 mg de músculo de camarón con 500 µL de TRIzol®, posteriormente, se agregaron 200 µL de cloroformo, y se agitó vigorosamente. Se incubó durante 5 min en frío, y después se centrifugó a 17,418 x g durante 15 min a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se le agregaron 500 µL de TRIzol® nuevamente para repetir el procedimiento.

A la fase acuosa recuperada, se le agregó un volumen de alcohol isopropílico frío, y se incubó toda la noche a -20°C. Posteriormente, se centrifugó a 17,418 x g durante 15 min a 4°C y se descartó el sobrenadante, mientras que al pellet se resuspendió en 1 mL de solución de alcohol/agua (alcohol etílico al 75 % con agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.1 %) e inmediatamente se centrifugó a 4,233 x g durante 5 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y al precipitado formado se le agregó nuevamente 1 mL de solución de alcohol/agua y se repitió el procedimiento. El pellet se dejó escurrir para eliminar el exceso de alcohol etílico y finalmente se resuspendió en 25 µL de agua DEPC 0.1 %.

Cuantificación y Evaluación de la Integridad del ARN Total

La concentración y pureza del ARN total aislado se evaluó por triplicado utilizando las absorbancias 260 y 280 nm, en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000. Para determinar que el ARN total extraído no estaba degradado y podría ser utilizado, se evaluó la integridad del mismo mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Se mezclaron 2 µg de ARN total con 2.5 µL de buffer carga 6X (glicerol 50 %, EDTA 1 mM pH 8, azul de bromofenol 0.25 %, xileno cianol FF 0.25 %) en un microtubo y se incubó a 65°C durante 10 min y posteriormente se colocó en hielo. La mezcla se cargó en un gel de agarosa teñido con SYBR Safe ® DNA gel stain (Invitrogen, USA) y la electroforesis se corrió a 60V en buffer TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X. Para observar las bandas de las subunidades correspondientes del ARN ribosomal, se utilizó el fotodocumentador de luz UV Gel Doc EZ (Biorad, USA) con el programa Image Lab™ (Biorad, USA).

Eliminación del ADN Genómico Contaminante en el ARN Total

Se eliminó la contaminación con ADN genómico (ADNg) presente en las muestras de ARN total extraídas del músculo de los camarones, utilizando DNase I recombinant RNase-Free (10 U/µL, ROCHE, USA). A 5 µg de ARN total se le agregó 1 µL de buffer de incubación 10X (Tris-HCl 400 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 60 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7.9), 2.3 µL de DNase, y se llevó a un volumen final de 14 µL con agua DEPC al 0.1 %. Cada reacción se incubó a 35°C por 20 min, después a 75°C por 10 min y finalmente se colocó en hielo.

Para comprobar la limpieza del ARN total, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando oligonucleótidos específicos del gen de la enzima digestiva tripsina del camarón blanco. En la reacción de PCR se mezclaron 12.5 µL de Taq PCR Master Mix® (250 U, QIAGEN, USA), 1 µL del oligonucleótido TrypFw 20 µM (5'-TCCTCTCCAAGATCATCCAA-3') y 1 µL del oligonucleótido TrypRv 20 µM (5'-ATTGGCCTTAATCCAATCGAC-3'), 200 ng de ARN total se usaron como templado, y se llevó la reacción a un volumen final de 25 µL. Se incluyó un control positivo, el cual se realizó de igual manera pero se utilizaron como templado 200 ng de ADNg de músculo de camarón previamente aislado.

La amplificación de los productos por PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de 95°C por 3 min, seguido de 33 ciclos a 95°C por 45 s, 50°C por 1 min, 72°C por 2 min y un alineamiento final de 72°C por 10 min. Las reacciones de PCR analizaron colocando 15 µL de la reacción en un gel de agarosa al 1 %, teñido con SYBR safe® DNA gel stain (Invitrogen, USA), posteriormente se corrió en buffer TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X, utilizando un voltaje de 70 V. La visualización de las bandas se realizó con el fotodocumentador de luz UV Gel Doc EZ (Biorad, USA) con el programa Image Lab™ (Biorad, USA).

Síntesis de ADN Complementario la Evaluación de la Expresión Génica

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó para evaluar de manera semicuantitativa la expresión de los transcritos de ANT, así como los del gen constitutivo L8. El ADNc se sintetizó siguiendo las instrucciones de manufactura del kit GoScript™ Reverse Transcription System (PROGEMA, USA), por lo que a 5 µg de ARN total de músculo libre de contaminación con ADNg, se le agregó 1 µL de OligodT, se incubó a 70°C por 5 min, y posteriormente se colocó 5 min en hielo. Después se agregaron 4 µL del buffer de reacción GoScript™ 5X, 4 µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µL de dinucleótidos 10 mM, 1 µL de inhibidor RNasin® y 1 µL de GoScript™ transcriptase reverse. La mezcla se incubó a las condiciones de temperatura siguientes: 25°C por 5 min, 42°C por 60 min, 70°C por 15 min e inmediatamente después se colocó en frío.

Para comprobar la síntesis de ADNc se realizó una amplificación en PCR utilizando oligonucleótidos específicos para el transcrito del gen que corresponde a la proteína ribosomal L8. Se mezclaron 12.5 µL de Taq PCR Master Mix®, 1 µL de oligonucleótido L8Fw1 20 mM (5'-GAAGAGGATCGGTGTTCAAGT-3') y 1 µL de oligonucleótido L8Rv1 20 mM (5' CTCCTGAAGGAAGCTTTACAC-3'), 200 ng de ADNc como templado, y la reacción se llevó a un volumen final de 25 µL. Como control positivo, se realizó la misma reacción pero utilizando 200 ng de templado de un ADNc de músculo del camarón, el cual ya estaba comprobado que amplificaba para L8. Las condiciones de temperatura fueron: 1 ciclo de 95°C por 3 min, 40 ciclos a 95°C por 30 s, 54°C por 30 s, 72°C por 30 s, y 72°C por 10 min como extensión final.

Los productos de PCR amplificados analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR safe® DNA gel stain, aplicando un voltaje de 70 V. La visualización de las bandas se realizó con el fotodocumentador de luz UV Gel Doc EZ (Biorad, USA) con el programa Image Lab™ (Biorad, USA).

Diseño de Oligonucleótidos y Evaluación de la Expresión Génica de ANT en el Músculo de *Litopenaeus vannamei*

Para la evaluación de la expresión génica de las dos isoformas de ANT en *L. vannamei*, se verificó que las dos secuencias nucleotídicas reportadas de ANT para este organismo correspondieran a isoformas distintas, ANT2 (GenBank No. GI: JN182810) reportada por Yin y col. (2012) así como ANT (GenBank No. GI: 374722919) reportada por Ma y col. (2014). Para lograr lo anterior se hizo un alineamiento de nucleótidos y de la proteína deducida de aminoácidos de las dos secuencias, para ver el porcentaje de identidad, utilizando el algoritmo ClustalO y BLAST® del NCBI. Posteriormente se diseñaron oligonucleótidos específicos tanto de ANT, como de ANT2 usándose como molde las secuencias ya reportadas. Debido a que no se especifica qué isoforma de ANT es la secuencia reportada por Ma y col (2014), en este trabajo se nombró como *LvANTX*, mientras que la reportada por Yin y col. (2012) se nombró *LvANT2*. Para evaluar las propiedades de los oligonucleótidos a diseñados se utilizó la herramienta OligoEvaluator™ de Sigma-Aldrich®.

La evaluación de la expresión génica de las isoformas *LvANTX*, *LvANT2* y así como de L8 como gen constitutivo se hizo de manera semi-cuantitativa. Se realizó PCR de punto final por triplicado de cada muestra de ADNc de músculo de camarón, utilizando los oligonucleótidos específicos sentido y antisentido de la isoforma *LvANTX*, (ANTX_Fw 5'-GCTCTACGACGAAATCCAG-3' y ANTX_Rv 5'-CAAGGTGAAACAGTGATGAG-3'), para la isoforma *LvANT2* (ANT2_Fw 5'-GCTTAGTCTTCTGCCATGTG-3' y AN2_Rv 5'-GAAAATTGGTGACATTTGTGG-3') y L8 (L8F1 y L8R1).

Cada reacción de PCR se realizó mezclando 12.5 µL de Taq PCR Master Mix®, 1 µL de oligonucleótido sentido 20 µM y 1 µL de oligonucleótido antisentido 20 µM, específicos para cada transcrito, 210 ng de ADNc como templado, y la reacción se llevó a un volumen final de 25 µL con agua Mili-Q estéril. Las condiciones de temperatura para la amplificación

por PCR fueron las siguientes: 1 ciclo a 95°C por 3 min, 40 ciclos de 95°C por 30 s, 54°C por 30 s, 72°C por 30 s, y un alineamiento final de 72°C por 10 min. Todos los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con SYBR safe® DNA gel stain, y el análisis de la intensidad de las bandas se realizó con el fotodocumentador de luz UV Gel Doc EZ (Biorad, USA) con el programa Image Lab™ (Biorad, USA). El mismo programa fue utilizado para medir la intensidad de las bandas que se utilizaron para evaluar y comparar la expresión de genes.

Obtención de Mitocondrias de Músculo del *Litopenaeus vannamei*

Se aislaron las mitocondrias del músculo disectado de los organismos que se sometieron a las condiciones del bioensayo. La extracción mitocondrial se hizo siguiendo el método de Jimenez-Gutierrez y col. (2014) con algunas modificaciones. Se utilizaron 2.0 g del músculo de cada camarón muestreado durante el bioensayo y a cada muestra se le agregó un volumen de buffer de extracción 1 frío (sacarosa 0.125 M, sorbitol 0.375 M, KCl 150 mM, EGTA 1 mM, albúmina sérica de bovino (BSA) 0.5 %, K-HEPES 20 mM, pH 7.5). El tejido se homogenizó con un homogenizador a baja velocidad, cuidando que no se caliente. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 3,024 x g por 1 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante, y este último se centrifugó a 17,418 x g durante 15 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y al pellet formado se le agregaron tres volúmenes de buffer de extracción 2 frío (sacarosa 0.125 M, sorbitol 0.375 M, KCl 150 mM, EGTA 0.025 mM, BSA 0.5 %, K-HEPES 20 mM, pH 7.5) y se disolvió suavemente utilizando un pincel de pelo de camello.

Las muestras se centrifugaron a 1,089 x g durante 5 min a 4°C y se colectó el sobrenadante en un tubo limpio y nuevamente se centrifugó a 17,418 x g por 15 min a 4°C. Debido a la cantidad de colágeno presente en el extracto mitocondrial, se hicieron dos lavados adicionales, por lo que se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con tres volúmenes de buffer de extracción 2 y se centrifugó a 726 x g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante recuperado fue centrifugado a 17,418 x g durante 15 min a 4°C, y el pellet formado fue nuevamente resuspendido con tres volúmenes de buffer de extracción 2 frío, y centrifugado a 726 x g durante 10 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y finalmente se centrifugo por última vez a 17,418 x g durante 15 min a 4°C. El pellet obtenido al final se

disolvió en la menor cantidad posible de buffer de extracción 2, con la finalidad de que las mitocondrias no se encontraran muy diluidas para su posterior utilización.

Cuantificación de Proteína Mitocondrial en el Músculo del Camarón Blanco

La cuantificación de la proteína soluble mitocondrial se realizó con el método de Bradford (Kruger, 2009, Bradford, 1976). Primeramente, se hizo una curva estándar para la cual se preparó una solución madre de BSA a 2 mg/mL y se prepararon diluciones a 2, 1.3, 1, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.0625 mg/mL. En una microplaca transparente de fondo plano se colocaron por triplicado 45 μ L de agua, 5 μ L de cada dilución y 250 μ L del reactivo Bradford 1X, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se tomaron las lecturas de absorbancia a una longitud de onda (λ) de 595 nm en un lector de microplaca iMark™ (Biorad, USA). Se graficaron los valores de concentración de BSA contra la absorbancia obtenida para cada dilución, y se calculó la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación.

Para la evaluación de la concentración de la proteína mitocondrial extraída del músculo de los camarones, se hizo una dilución 1:40 con agua Mili-Q de cada una de las muestras, así como un blanco, el cual solo contenía 40 μ L de agua Mili-Q. Después se agregaron 2 μ L de tritón al 1 % a cada dilución, se agitaron vigorosamente en un vórtex durante 10 s y se centrifugaron a 6,048 $\times g$ durante 10 s. Se colocaron 5 μ L del sobrenadante de cada muestra por triplicado en la microplaca, 45 μ L de agua Mili-Q y 250 μ L del reactivo Bradford 1X, posteriormente, se incubó a temperatura ambiente por 5 min, y se leyó la absorbancia a λ de 595 nm.

Cuantificación de ATP en Mitocondrias del Músculo de *Litopenaeus vannamei*

La cuantificación de ATP tanto en mitocondrias como en plasma de camarón se determinó mediante luminiscencia con el Kit ATP assay (Calbiochem®, EMD, Biosciences, USA), utilizando el lector de microplacas Varioskan™ LUX multimode (Thermo Fisher Scientific). Se hizo una curva estándar preparando una solución madre de ATP a 1 mg/mL y partiendo de

ella se hicieron cinco diluciones 1:10. Posteriormente, en una microplaca de fondo plano de color blanca se colocaron por triplicado 100 μ L de Nucleotide Releasing Buffer, 10 μ L de cada dilución y 1 μ L de luciferasa, se incubó por 10 min y la luminiscencia se detectó en el espectro de luz visible. Los datos se graficaron y se obtuvo la ecuación de recta y el coeficiente de correlación.

Para la evaluación del ATP en las mitocondrias aisladas se colocaron 100 μ L de Nucleotide Releasing Buffer, 1 μ L de luciferasa y la proteína mitocondrial se agregó a una concentración final de 0.5 mg/mL. La mezcla para la cuantificación de ATP en mitocondrias se incubó durante 10 min y la luminiscencia se detectó en el espectro de luz visible.

Modelación *in silico* de las Isoformas LvANTX y LvANT2 de *Litopenaeus vannamei*

Las modelaciones predictivas de las isoformas LvANTX y LvANT2 se hicieron mediante herramientas bioinformáticas. Los modelos teóricos fueron construidos con base en las comparaciones por homología con el modelo proteico de ANT1 de *Bos taurus* (PDB: 1OKC), presentando un porcentaje de identidad de 81 % tanto para LvANTX como LvANT2, utilizando el servidor Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>) (Arnold y col., 2006, Kelley y col., 2015). La visualización y edición de los modelos construidos se hizo con el programa PyMOL™ Molecular Graphics System v.1.7.5.0. y el programa CCP4MG v.2.10.6. (McNicholas y col., 2011).

Análisis Filogenético de LvANTX y LvANT2 del Camarón Blanco *L. vannamei*

Se construyó un árbol filogenético por medio de distancias genéticas para evidenciar las relaciones evolutivas entre ANT de *L. vannamei* con diferentes especies. Se analizaron 30 secuencias de aminoácidos de ANT de vertebrados e invertebrados que se encuentran disponibles en el GenBank, incluyendo las reportadas de ANT en *L. vannamei*. Se eliminaron todas las posiciones con cobertura de sitio inferior al 95 %, es decir, se permitieron menos de 5 % de lagunas de alineación, datos faltantes y bases ambiguas en cualquier posición.

Dichas secuencias fueron alineadas mediante el algoritmo Clustal Ω (Sievers y col., 2011) y se usó el método del vecino más cercano NJ (Neighbor-Joining, de su traducción en inglés) (Saitou y Nei, 1987).

El árbol consenso fue inferido a partir de 1000 repeticiones, para representar la similitud de los taxones analizados. Las ramas correspondientes a particiones reproducidas en menos de 50% de réplica de arranque fueron eliminadas, mientras que el porcentaje de réplicas del árbol en los taxones agrupados en la prueba de arranque (1000 réplicas) se muestra en las ramas (Felsenstein, 1985). Se calcularon las distancias genéticas mediante el método de la matriz basado en JTT (Jones-Taylor-Thornton) (Jones y col., 1992) y todos los el análisis se realizaron con el software MEGA6 (Tamura y col., 2013).

Análisis Estadístico

Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para evaluar la distribución normal de los datos obtenidos de la expresión génica y cuantificación de ATP, así como la prueba de Tukey-Kramer con un 95 % de confiabilidad para encontrar diferencias entre las medias, usando el programa NCSS 2007 (U.S.A.).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Comparación de las Secuencias de Nucleótidos y Deducida de Aminoácidos de LvANTX y LvANT2

La comprobación de que las dos secuencias reportadas de ANT de *L. vannamei* son diferentes se realizó mediante un análisis bioinformático descrito previamente en la metodología, en el que se arrojó un porcentaje de identidad del 88 % con una cobertura del 65 % de las secuencias de ambos transcritos. En la Figura 9 se muestra el alineamiento de las secuencias de LvANTX y LvANT2. Con el análisis del alineamiento de ambas secuencias se observó que la región 3'-UTR es donde hay mayores diferencias en la secuencia de nucleótidos, por lo que esta región fue utilizada para el diseño de los oligonucleótidos que se utilizaron para la evaluación de la expresión de los transcritos.

LvANTX	GGCCGAGACCTGTCTGGACCAAGAGCTCCCGCGCACACTCGACAGCCCAAATGGGA	60
LvANT2	GACCTTTG--GGATTTGTGTAGACAAGGACGCTGCTATACACTCCACCACCATGTCGA	58
	* ** *	
LvANTX	AGGCCTTCGATCCTATGAGCTTCGTGAAGGACTTTCTGGCCGGAGGCATCGCCGCCGG	120
LvANT2	AGGCCTTCGATCCTATGAGCTTCGCCAAGGATTTTATCGCCGGTGGCATCGCCGCCGA	118
	*** ***** *	
LvANTX	TGTCCAAGACCGCCGTGCGCCCATCGAGCGGTGAAGCTCCTGCTGCAGGTCCAGGCGG	180
LvANT2	TTCCAAGACCGCCGTGGCGCCCATCGAGAGGGTGAAGCTCCTGCTGCAGGTCCAGGCGG	178
	* *	
LvANTX	TGTCCAACAGATCAGCGCCGACCAGGCCTACAAGGCATGGTGCAGTCTTCGTCGGTA	240
LvANT2	CCTCCAAGCAGATCAGGCGGACAAGCGGTACAAGGCATGTTGATGCTTGTCCGCA	238
	***** ***** *	
LvANTX	TCCCAAGGAACAGGGCGTCTTGCATACTGGCGGGTAACTTGGCCAACGTTATTCGTT	300
LvANT2	TCCCAAGGAACAGGGTGTCTTGCATACTGGCGTGTAACTTGGCCAACGTTATTCGAT	298
	*** *	
LvANTX	ACTTCCCAGCAGGCCCTCAACTTCGCCTTCAAGGACAAGTACAAGCAGATTTTCCTTG	360
LvANT2	ATTTCCCACCAGGCTCTCAACTTCGCCTTCAAGGACAAGTACAAGCAGATCTTCCTCG	358
	* *	
LvANTX	GTGGCGTAGACAAGAAGACACAGTTCGTGGAGTTCCTTGGTAACTTGGCTCCGGTG	420
LvANT2	GTGGCGTAGACAAGAAGACACAGTTCGTGGAGTTCCTTGGTAACTTGGCTTCTGGTG	418
	***** ***** *	
LvANTX	GTGCGGTGGTGAACCTCCCTTTGCTTCGCTACCCCTTGATTCGCTCGAACCAGGC	480
LvANT2	GTGCTGCTGGTGAACCTCCCTTTGCTTCGCTACCCCTTGATTCGCTCGAACCAGGT	478
	**** *	
LvANTX	TTGCTGCCGATATCGGCAAGGGCGCCGCGCCAGCGTGAATCAATGGCTTAGGAGACTGCC	540
LvANT2	TAGCTGCTGATATTGGCAAGGGCGTGGTCAGCGTGAATCAATGGTTGGGAGACTGTC	538
	* *	
LvANTX	TCGTCAAGATCTCAAGGCTGATGGCCTCGGTGGTGTACCGCGCTTCGGCGTGTCTG	600
LvANT2	TTGTAAAGATCTCAAGGCTGATGGCATCATGGTGTGTACCGTGGCTTCGGAGTATCTG	598
	* ** *	
LvANTX	TGCAGGCATCATCATCTACCGCGCCGCTTCTTCGGCCTCTACGATACCGCAAAGGGCA	660
LvANT2	TACAGGTATCATCATCTACCGCGCCGCTTCTTCGGCCTCTACGACACAGCTAAGGGCA	658
	* *	
LvANTX	TGCTGCCTGACCTAAGAGCGTGGCATCATCGTCTCCTGGGCTATGCGCAGACCGTGA	720
LvANT2	TGTTGCCTGATCCTAAGAGTGTGGCATCATCCTCTCATGGGCTATGACACAGACCGTGA	718
	** *	
LvANTX	CCACCATCTCCGGCATCATCTCCTATCCCTTCGACACTGTGCGTAGGCGCATGATGATGC	780
LvANT2	CCACCATCTCCGGCATCATCTCCTATCCCTTCGACACTGTGCGTAGGCGCATGATGATGC	778
	***** ***** *	
LvANTX	AGTCCGGTCGCAAGGGCGCTGATATCATCTACAAGAACCATTGATTGCTGGAGGAAGG	840
LvANT2	AGTCTGGTCGCAAGGGTGTGATATCATGTACAAGAACCATTGACTGCTGGAGAAGA	838
	**** *	
LvANTX	TCGCTAAGAACGAGGGTACCGCGCCTTCTTCAAGGGCGCTTCTCCAACGTCCTTCGTG	900
LvANT2	TTGCCAAGAATGAAGGTAGTGTGCTTCTTCAAGGGTGCCTTCTCAAATGTTCTCCGTG	898
	* ** *	
LvANTX	GTAAGTGGTGGCCCTTGTGCTGGTCTTACGACGAAATCCAGTCTCTTCGGAA	960
LvANT2	GTAAGTGGTGGTGGCCCTTGTGCTGGTCTTACGACGAAATCCAGTCTCTTCGGAA	958
	***** ***** *	
LvANTX	CCAAGTCTGGCGCGCGAAATACATCAATGGCAAGACTTCTTGCTTCCTTCTTTTCA	1020
LvANT2	CTGCAGCGAAGAGTGGCGAAATACATCAATGGCAAGACTTCTTGCTTCCTTCTTTTCA	1018
	* *	

LvANTX	<u>T</u> TTCACGAACAATGCGGTTTGCGAAATTAATAAACGAAGCAAGCAAGGAACCGAGAGA	1080
LvANT2	<u>T</u> CGAGATACTGGATGGGGATGACAGAA-----AATG-----GTGGGGTGAAAGA	1062
	* *	
LvANTX	ACAATGAGTGTGTGGGGGAAAGCGGTGAAAATAACTGAGCTTACGCGCACATGGGAC	1140
LvANT2	GGACTGCT-----GTTGGGTATGCATA-----AGCAAAAATTCAG	1098
	* *	
LvANTX	ACCTACAGCTTTAGCTCATCACTGTTTCACCTTGTGTATAGTACATAGTTCATGGAAC	1200
LvANT2	CCCAAAGG-----CTTAGTCTTCTGCCATGGTATAGTAAATAGTTCATGAACT	1149
	* *	
LvANTX	TTATGCAGATTCTGTCCAAGAAGTAGACTACAGGTTTGTATTATAC---AAATCCAATGCA	1257
LvANT2	GTAATGCTGTCAGCATGTAGATCTACAGATTGATGCCCATGTTCAATGTTTATA	1208
	* *	
LvANTX	TTTTTTTATAGGAAGAGACTCTCGGACCATAAATTTTGTAAAAAGAAATAATGTATATGTA	1317
LvANT2	TTAATTATAAAGTGGGATTTTAGAACATAGT--TTGTACAGAATA-----	1252
	* *	
LvANTX	TATTTATGTTCAAATGCATAGTCTACATCACACGAGAGACCCGACTGGTGAAACCATT	1377
LvANT2	-----TCAAATCAGAAAGCCACAAATGTCACCAATTTTCAATGGCAAACCATT	1302
	* *	
LvANTX	CCTGTAATGCTCGTATATTTT--AAGTTATATAAATGAAACAAATCTCTAAAAAAAAAAAA	1436
LvANT2	CCTGTAATAAATATCATAAGTAAAAAAAAATAAAAAAAAAATCGAAACACTGAAAAAAAAAAAA	1362
	* *	
LvANTX	AAAAAAAAA	1445
LvANT2	AAAAAAAAA	1371
	* *	

Figura 9. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de LvANTX y LvANT2. En negro y gris se resaltan las regiones 5'-UTR y 3'-UTR, respectivamente. En color azul se encuentra el codón de inicio y el de término se muestra en verde. Oligonucleótidos sentido (Fw) y antisentido (Rv) para LvANTX, subrayado sencillo. Oligonucleótidos diseñados para LvANT2, subrayado doble.

Por otro lado, se hizo un alineamiento múltiple de las secuencias deducidas de aminoácidos de LvANTX (GenBank No. GI: 374722920) y LvANT2 (GenBank No. GI: 340842896). En la Figura 10 se muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos, presentando un porcentaje de identidad del 92 % con una cobertura del 100 % de la secuencia para ambas isoformas. Además se observó que hay más diferencias en la secuencia de aminoácidos en los extremos N-terminal y C-terminal, por lo que siendo ANT una proteína altamente conservada entre especies (Santamaria y col., 2004), se sugiere que estas dos secuencias se tratan de isoformas diferentes.

Se puede observar que ambas secuencias de ANT del camarón contienen las firmas características de las familias de los acarreadores de nucleótidos de adenina **RRRMMM** (resaltados en negro) (Pebay-Peyroula y col., 2003), mientras que las prolina P30, P135 y

P232 son los residuos conservados en la familia de los acarreadores mitocondriales (Mitocarrier Family, MCF) (resaltadas en amarillo). Los residuos de aminoácidos K25, R82, R190, R237, R238 y R282 corresponden al sitio de unión a los nucleótidos de adenina (en verde), y el residuo P62, el posible sitio de unión a CyP-D descrito por Halestrap y Brenner (2003), resaltado en rojo.

```

D. melanogaster MGDEGGGGHGHKGLKSLMDFMMGGVSAAIATAVAP IERVKLLIQVQEVSKQIAADQR 60
H. sapiens -----MTDAAVSFAKDFLAGGVAAAISS TAVAP IERVKLLLQVQHASKQITADKQ 50
B. taurus -----MTDAAVSFAKDFLAGGVAAAISS TAVAP IERVKLLLQVQHASKQITADKQ 50
M. musculus -----MTDAAVSFAKDFLAGGVAAAISS TAVAP IERVKLLLQVQHASKQITADKQ 50
S. paramamosain -----MGKAFDPVSFMKDFFAAGGIAAAISS TAVAP IERVKLLLQVQAASKQITADKA 52
LvANTX -----MGKAFDPMSFVKDFLAGGIAAAVSS TAVAP IERVKLLLQVQAVSKQISADQA 52
LvANT2 -----MSKGFDPMSFAKDFIAGGIAAAISS TAVAP IERVKLLLQVQAASKQITADKA 52
** ** *::**::*****:*** .***:*.

D. melanogaster YKGIIDCVVRIIPKEQGVLSFWRGNLANVIRYFPTQALNFAFKDVYKSVFLGGVDKHKQFW 120
H. sapiens YKGIIDCVVRIIPKEQGVLSFWRGNLANVIRYFPTQALNFAFKDKYKQIFLGGVDKRTQFW 110
B. taurus YKGIIDCVVRIIPKEQGVLSFWRGNLANVIRYFPTQALNFAFKDKYKQIFLGGVDKRTQFW 110
M. musculus YKGIIDCVVRIIPKEQGVLSFWRGNLANVIRYFPTQALNFAFKDKYKQIFLGGVDKRTQFW 110
S. paramamosain YKGMVDCFVRIIPKEQGVLAYWRGNLANVIRYFPTQALNFAFKDKYKQIFLGGVDKRTQFW 112
LvANTX YKGMVDCFVRIIPKEQGVLAYWRGNLANVIRYFPTQALNFAFKDKYKQIFLGGVDKRTQFW 112
LvANT2 YKGMVDCFVRIIPKEQGVLAYWRGNLANVIRYFPTQALNFAFKDKYKQIFLGGVDKRTQFW 112
***:*. :*****. :*****:*** .***:*.

D. melanogaster RHFAGNLASGGAAGATSLCFVYPLDFARTRLAADVGGKGNREFNGLIDCLMKVIKSDGP 179
H. sapiens LYFAGNLASGGAAGATSLCFVYPLDFARTRLAADVGGKAGAEREFRGLGDCLVKIYKSDGI 170
B. taurus RYFAGNLASGGAAGATSLCFVYPLDFARTRLAADVGGKAGAEREFRGLGDCLVKIYKSDGI 170
M. musculus RYFAGNLASGGAAGATSLCFVYPLDFARTRLAADVGGKAGAEREFRGLGDCLVKIYKSDGI 170
S. paramamosain RFFVGNLASGGAAGATSLCFVYPLDFARTRLAADIGKGPEQREFKGLGDCLAKIFKADGP 172
LvANTX RFFVGNLASGGAAGATSLCFVYPLDFARTRLAADIGKGAGQREFNGLGDCLVKIFKADGL 172
LvANT2 RFFVGNLASGGAAGATSLCFVYPLDFARTRLAADIGKGAGQREFNGLGDCLVKIFKADGI 172
. * *****:*** .***:*.

D. melanogaster IGLYRGFIVSVQGIIVYAAAYFGFYDTCRDFLPNPKSTPFYVSWAIAQVTTTAVAGIASYF 239
H. sapiens KGLYQGFNVSVQGI I IYAAAYFGIYDTAKGMLDPKNTHFISWMIQTVTAVAGLTSYF 230
B. taurus RGLYQGFNVSVQGI I IYAAAYFGIYDTAKGMLDPKNTHFISWMIQSVTAVAGLTSYF 230
M. musculus KGLYQGFNVSVQGI I IYAAAYFGIYDTAKGMLDPKNTHFISWMIQSVTAVAGLTSYF 230
S. paramamosain IGLYRGFVSVQGI I IYAAAYFGFYDTCRDFLPNPKSTPFYVSWAIAQVTTTAVAGLTSYF 232
LvANTX GGLYRGFVSVQGI I IYAAAYFGIYDTAKGMLDPKNSAGIIVSWAIAQVTTTAVAGLTSYF 232
LvANT2 MGLYRGFVSVQGI I IYAAAYFGFYDTCRDFLPNPKSTPFYVSWAIAQVTTTAVAGLTSYF 232
***:*. :*****:*** .***:*.

D. melanogaster FDTVRRRMMMQSGLKKESEMYKNTAHCWLVIKQEGIGAFFKGAALSNIITGTGALVLA 299
H. sapiens FDTVRRRMMMQSGRKGTDIMYTGTLDCWRKIARDEGGKAFFKGAWSNVLRGMGGAFVLA 290
B. taurus FDTVRRRMMMQSGRKGTDIMYTGTLDCWRKIARDEGAKAFAFFKGAWSNVLRGMGGAFVLA 290
M. musculus FDTVRRRMMMQSGRKGTDIMYTGTLDCWRKIARDEGSKAFAFFKGAWSNVLRGMGGAFVLA 290
S. paramamosain FDTVRRRMMMQSGRKSGEIMYKNTLDCWRKIARDEGTAFAFFKGAWSNVLRGMGGAFVLA 292
LvANTX FDTVRRRMMMQSGRKGADIIYKNTIDCWRKIVAKNEGTGAFAFFKGAWSNVLRGMGGAFVLA 292
LvANT2 FDTVRRRMMMQSGRKGADIMYKNTIDCWKKIKNESAAFFKGAWSNVLRGMGGAFVLA 292
***** * :::*. * .** :::** ***** :::** ***:*.

D. melanogaster YDEMKKYF----- 307
H. sapiens YDEIKKYT----- 298
B. taurus YDEIKKFT----- 298
M. musculus YDEIKKYT----- 298
S. paramamosain YDEIQVLLFGSKSGGGE 309
LvANTX YDEIQVLLFGTKSGGGE 309
LvANT2 YDEIQVLLFGSAAKSGE 309
***:

```

Figura 10. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de LvANTX y LvANT2. En negro se resalta la firma de los acarreadores de nucleótidos de adenina. En color amarillo se encuentran los residuos de prolina de la MCF. En verde, los sitios de unión a nucleótidos de adenina, y el rojo el posible sitio de unión a CyP-D. Se añadieron secuencias de: ANT2 de *D. melanogaster* (NP_511110.1), ANT2 de *H. sapiens* (NP_001143.2), ANT2 de *B. taurus* (NP_777084.1), ANT2 de *M. musculus* (NP_031477.1) y ANT2 de *S. paramamosain* (AHC54390.1).

Integridad del ARN Total y Ausencia de ADNg Contaminante

La calidad del ARN total de tejido muscular de cada camarón muestreado en el bioensayo se pudo observar en los geles de agarosa. En la Figura 11 se observa la integridad del ARN aislado correspondientes a las muestras 1 a 6 de los camarones en el T0 del bioensayo. Se observó el patrón de bandeo para ARN ribosomal, específicamente la presencia de las subunidades 28S y 18S, significando que el ARN total es de buena calidad para su uso posterior, puesto que este mostró un patrón de bandeo indicativo que no se encontraba degradado.

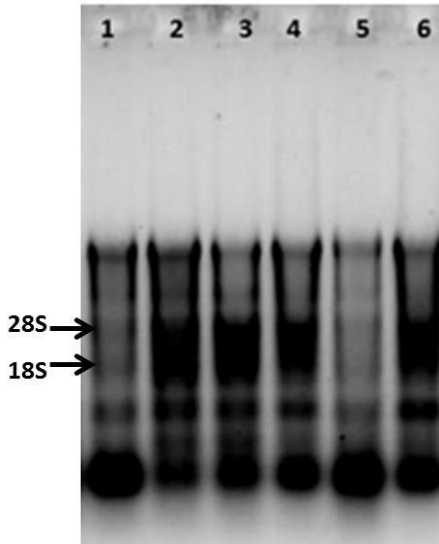


Figura 11. Análisis de integridad del ARN total extraído del músculo del camarón

Además, se pudo corroborar por PCR la eliminación del ADNg contaminante en el ARN total. En la Figura 12 se observa el análisis de las muestras de ARN total del músculo de los seis camarones del T0 del bioensayo (carriles 1-6), así como la amplificación de tripsina partiendo de ADNg como control positivo (carril 7). En este último se puede observar una banda de 500 pb que corresponde al producto amplificado de la tripsina en el tamaño esperado de acuerdo a los oligonucleótidos utilizados, por lo que la ausencia de bandas en los carriles 1-6 confirma la eliminación del ADNg en las muestras de ARN total, porque

dichas muestras carecían de ADN que pudiera amplificar con los reactivos añadidos a la reacción.

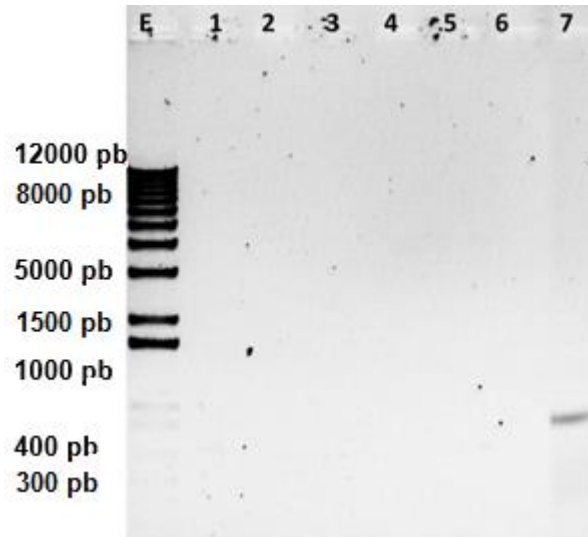


Figura 12. Análisis de la eliminación del ADNg contaminante en ARN total. Carriles 1-6: Productos de PCR obtenidos con ARN total de músculo de los seis camarones del T0 del bioensayo. Carril 7: Control positivo. E: marcador de peso molecular estándar.

Evaluación de la Síntesis del ADN complementario

Una vez comprobada la integridad y limpieza de las muestras de ARN total, se sintetizó ADNc y se pudo comprobar mediante PCR su funcionalidad. En la Figura 13 se muestra el análisis de los productos de PCR obtenidos utilizando el ADNc de los músculos de los organismos en el T0 del bioensayo (carriles 1-6). Se puede observar una banda en cada muestra en aproximadamente 400 pb, correspondiente al producto amplificado de L8, asimismo se ve en el carril 7 la banda que corresponde a un control positivo de L8. Lo que significa que se llevó a cabo correctamente la síntesis de ADNc ya que el gen L8 es constitutivo, es decir, siempre se está expresando en una forma estable, por lo que se puede confiar en la calidad de ADNc para realizar la expresión de los genes de interés.

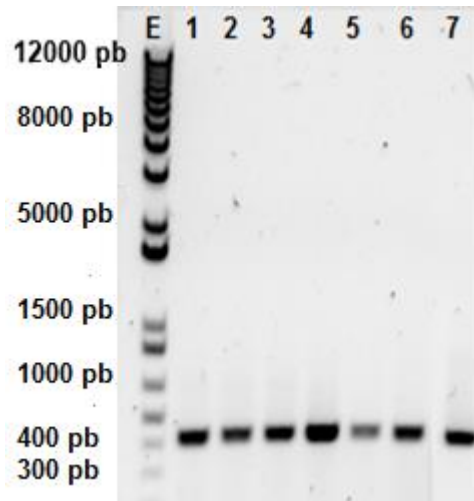


Figura 13. Análisis de los productos de PCR de la síntesis de ADNc. Carriles 1-6: ADNc del músculo de los seis camarones del T0 del bioensayo. Carril 7: control positivo de L8.

Efecto del Ejercicio Prolongado en la Expresión Génica de ANT del Camarón Blanco

Para observar el efecto del ejercicio prolongado sobre la expresión génica de *LvANTX* y *LvANT2* en el músculo de los camarones, se utilizaron los valores de intensidad de las bandas de los productos de PCR para cada transcrito, así como la de L8 que se utilizó como gen constitutivo. En la figura 14, se muestran los fragmentos obtenidos a partir de PCR para la expresión de los 3 transcritos, en el músculo de los camarones correspondientes a cada tiempo de muestreo del bioensayo. Se observó que los fragmentos se encuentran en los tamaños esperados de acuerdo a los oligonucleótidos utilizados, siendo *LvANTX* de 249 pb, *LvANT2* con 182 pb y L8 de 400 pb.

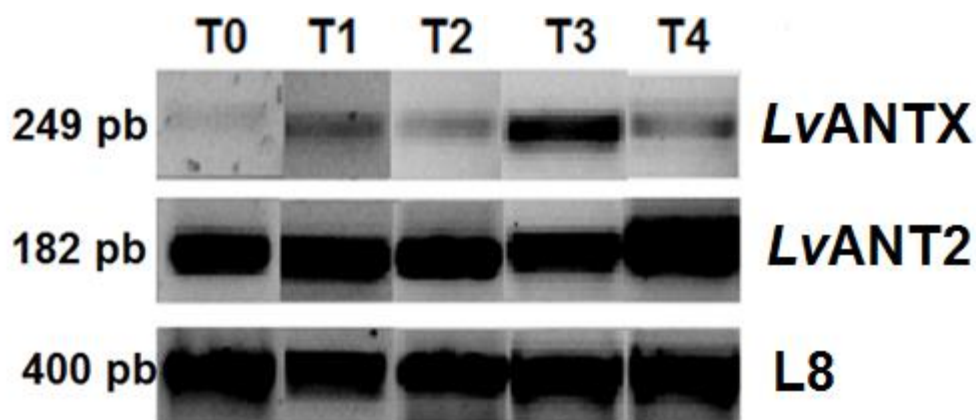


Figura 14. Análisis de expresión de *LvANTX*, *LvANT2* y *L8* en músculo de los camarones en cada uno de los tiempos del bioensayo. T0: controles sin ejercicio y sin ayuno; T1: 48 h de ayuno, sin ejercicio; T2: 54 h de ayuno y 6 h de ejercicio; T3: 60 h de ayuno y 12 h de ejercicio; T4: 64 h de ayuno y 16 h de ejercicio.

Los valores normalizados de la intensidad de la expresión génica de ambas isoformas de *LvANT* se graficaron. En la Figura 15 se muestra la gráfica correspondiente a la expresión de *LvANTX*, en donde se observa que en el tiempo T1 y T2 hubo un aumento de 1.2 y 2.4 veces respectivamente comparado con el control. La expresión máxima se obtuvo en el tiempo T3 teniendo un aumento de 3.1 veces. En el tiempo T4 el transcrito de *LvANTX* aumento 1.9 veces con respecto al control. Aun cuando no se obtuvieron diferencias significativas entre cada uno de los tiempos si se observa un aumento continuo de la expresión génica. Esto último se corroboró al observar una correlación positiva de acuerdo al análisis de Spearman (0.294) lo que significa que la expresión del transcrito de *LvANTX* tiende a aumentar conforme incrementa el tiempo de ejercicio y ayuno.

Por otro lado, en la Figura 16 se muestra la gráfica obtenida del promedio de los triplicados de la expresión de *LvANT2* normalizada con la de *L8*. Se puede observar que en los tiempos T1, T2 y T3 la expresión disminuye 1.8, 1.1 y 1.4 comparado con el control, mientras que en el tiempo T4 la expresión de *LvANT2* se incrementa 1.3 veces, siendo en este tiempo donde se presentó mayormente la expresión del transcrito. Los valores de expresión de *LvANT2* no presentaron diferencias significativas al igual que *LvANTX*, sin embargo, de acuerdo al análisis de Spearman el transcrito de *LvANT2* tiende a disminuir conforme aumenta el tiempo de ejercicio y ayuno ya que se obtuvo una correlación negativa (-0.087).

El incremento en la expresión del transcrito *LvANTX* ocurre primero que el de *LvANT2* a medida que incrementa el tiempo de ejercicio y el ayuno (T1, T2 y T3). En un estudio realizado por Stepien y col. (1992) se reportó que primeramente se expresa la isoforma ANT1 y posteriormente la de ANT2 en células en diferenciación de humanos. Los autores sugieren que esto sucede debido a que la célula requiere más cantidad de ATP, por lo tanto, requiere expresar mayormente los transcritos de ANT1 para translocar más rápidamente ADP/ATP y mantener los requerimientos energéticos de la célula.

Por otro lado, en este trabajo se puede observar que la expresión de ambas isoformas de *LvANT* incrementa a las cuando el ejercicio se ha realizado por 6 h (tiempo T2). Estos resultados concuerdan con lo reportado en el artículo de Booth y Neuffer (2005), en el que explican que los genes que codifican para proteínas que actúan dentro de la mitocondria de mamíferos se expresan más lentamente y de forma tardía, entre las 4 y 8 h de ejercicio, sin embargo las proteínas correspondientes persisten por más tiempo en el tejido.

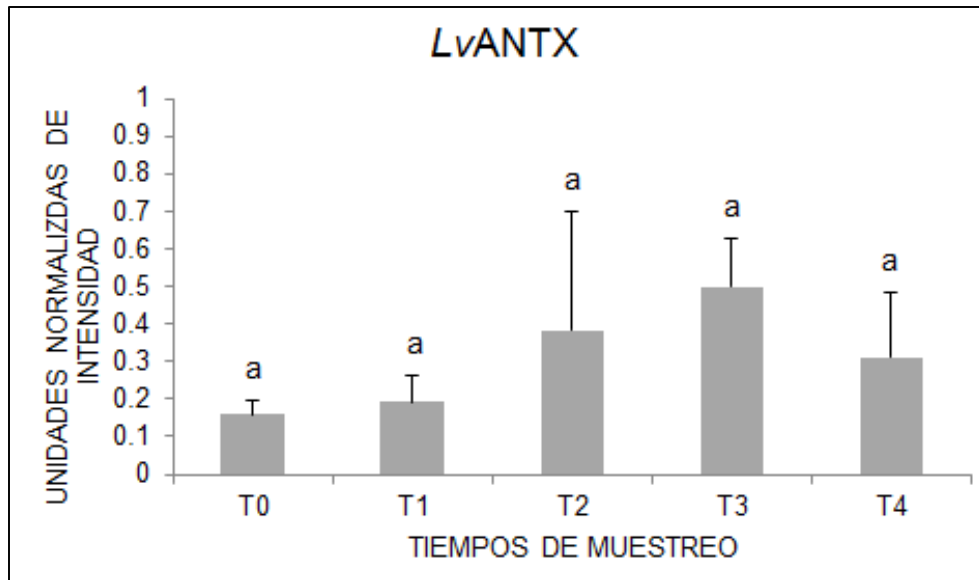


Figura 15. Expresión de *LvANTX* en el músculo de los camarones sometidos a ejercicio y ayuno prolongado. Las literales iguales indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos. Cada barra representan la media \pm error estándar ($p < 0.05$).

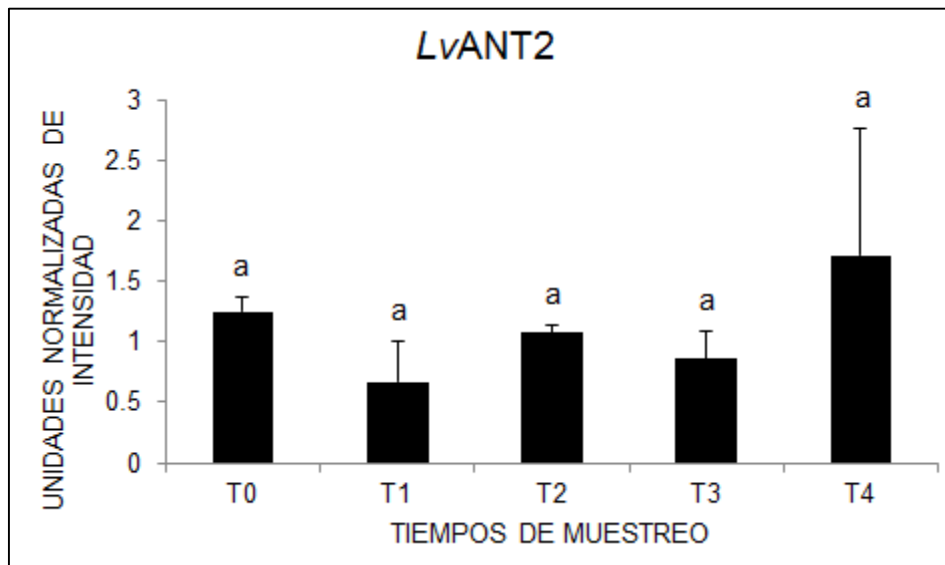


Figura 16. Expresión de *LvANT2* en el músculo de los camarones sometidos a ejercicio y ayuno prolongado. Las literales iguales indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos. Cada barra representa la media \pm error estándar ($p < 0.05$).

Por otro lado, en la Figura 17 se muestra la comparación de la expresión génica de *LvANTX* con la de *LvANT2* en cada uno de los tiempos del bioensayo. Si bien la correlación de la isoforma *LvANT2* fue negativa, se observó que la expresión de *LvANT2* es significativamente mayor que la de *LvANTX* en los tratamientos T0 y T4, mientras que en los tiempos T1, T2 T3 no se encontraron diferencias significativas en la expresión de ambos transcritos. Sin embargo, se observó que la expresión de *LvANT2* aumenta 3.5, 2.79 y 1.72 veces más que la de *LvANTX* en los tiempos T1, T2 y T3 respectivamente se expresa mayormente en cada una de los tratamientos (Figura 17).

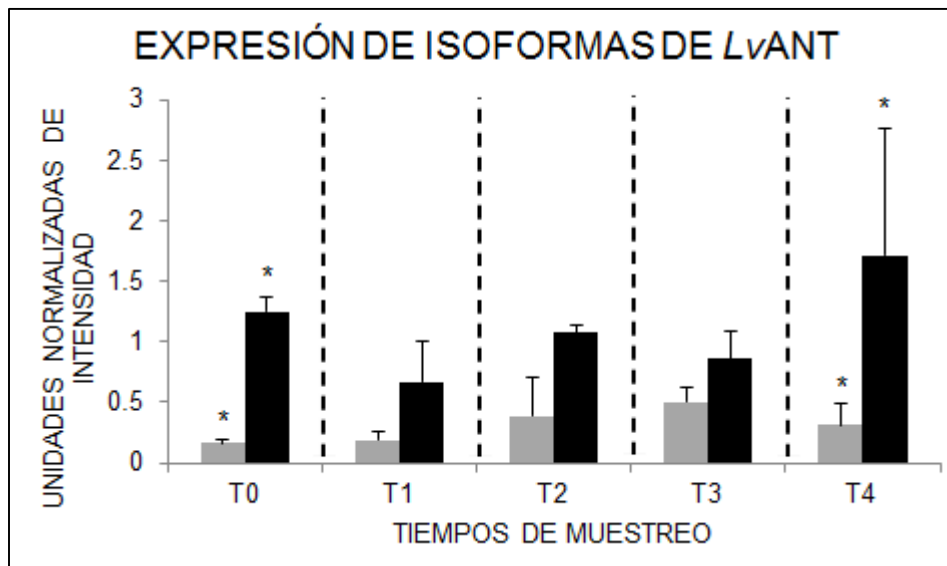


Figura 17. Comparación de la expresión de las isoformas de *LvANTX* (en color gris) y *LvANT2* (en color negro) en condiciones de bioensayo. Los asteriscos representan diferencias significativas entre los transcritos de ambas isoformas, específicamente para los tiempos indicados. Cada barra representa la media \pm error estándar ($n=3$, $p<0.05$).

Se ha reportado que en mamíferos la expresión de las isoformas de ANT es de manera diferencial y es tejido-específica (Doerner y col., 1997), mientras que las dos isoformas reportadas para el camarón blanco se expresan en todos los tejidos, pero mayormente en el músculo (Yin y col., 2012; Ma y col., 2014). En este trabajo se observó que la expresión de la isoforma *LvANT2* es mayor que la isoforma *LvANTX* (Figura 17). Estos resultados difieren con lo reportado para células en diferenciación de humanos, en donde ANT2 se expresa menos en comparación con el resto de las isoformas (Stepiens y col., 1992). Sin embargo,

en un estudio realizado por Levy y col. (2000) reportaron que la mitocondria del ratón carece de la isoforma ANT3, pero en su lugar expresa en mayor proporción la isoforma ANT2, sustituyendo la función que tiene ANT3 en el tejido muscular.

En el camarón blanco *L. vannamei* se ha demostrado que tanto la isoforma LvANTX como la LvANT2 se expresan en todos los tejidos, sin embargo, la expresión de ambas isoformas es mayor en el músculo (Yin y col., 2012; Ma y col., 2014). El hecho de que la expresión de LvANT2 sea mayor que LvANTX cuando los camarones son expuestos a ejercicio prolongado, puede ser por la manera en que se regula la expresión de estos dos transcritos de ANT en las células del camarón, como sucede en otros organismos (Murdock y col., 1999). Probablemente, LvANTX no se transcribe de manera abundante durante el ejercicio prolongado, pero la proteína generada tal vez es más activa que la sintetizada a partir del transcrito de LvANT2, sin embargo, para corroborar esto es necesario realizar más estudios acerca de la funcionalidad del translocador de nucleótidos de adenina.

Extracción de Mitocondrias y Cuantificación de Proteína Mitocondrial

Las mitocondrias obtenidas de la extracción a partir de cada músculo se cuantificaron utilizando la curva estándar de BSA y análisis de esta arrojó un coeficiente de correlación de 0.991, mientras que la ecuación de la recta fue $y=0.6404x+0.0604$ fue la ecuación de la recta. Los valores de absorbancia que se obtuvieron para cada extracto mitocondrial se sustituyeron en la literal "y" después despejada la ecuación y se obtuvo la concentración de la proteína mitocondrial soluble de cada muestra. En la Tabla 2 se puede observar que las concentraciones de proteína mitocondrial soluble están por encima de los 11 mg/mL en todos los tratamientos. Estos resultados se pueden contrastar con los obtenidos por Jiménez-Gutiérrez y col. (2014) en donde obtuvieron una concentración de proteína mitocondrial proveniente de músculo de 0.711 mg/mL, por lo que en este trabajo se obtuvo más concentración de proteína lo cual se relaciona con un mayor contenido de mitocondrias extraídas.

Tabla 2. Promedio de las concentraciones de la proteína mitocondrial de los músculos de camarón

Tratamiento	[mg/mL]
T0	11.81
T1	17.55
T2	16.47
T3	23.32
T4	18.08

Cuantificación del ATP Mitocondrial

El análisis de la curva de ATP realizada para la cuantificación del ATP mitocondrial arrojó un coeficiente de correlación de 0.99 mientras que la ecuación de la curva fue $y=0.0014x+16.831$. La sustitución de los valores de luminiscencia obtenidos para cada reacción se aplicó en la ecuación de la recta, obteniéndose los valores en nM (nanoMolar) de ATP de las muestras de cada tratamiento.

En la Figura 18 se puede observar que la cantidad de ATP presente en las mitocondrias fue variable en cada uno de los tiempos de exposición al ejercicio y el ayuno. En el tiempo T0 (control, no ayuno, no ejercicio) las mitocondrias del músculo de los organismos tuvieron 95.74 nM, disminuyendo hasta 41.10 nM en el T1. En el T2 a las 6 h de ejercicio y 54 h de ayuno la cantidad de ATP volvió a subir hasta 60.89 nM, mientras que en el tiempo T3 bajo drásticamente a 5.07 nM siendo. Finalmente, en el tiempo T4 (16 h de ejercicio y 64 h de ayuno) incrementó discretamente hasta 19.48 nM de ATP, siendo estos dos últimos tiempos los que presentaron diferencias significativas con el control.

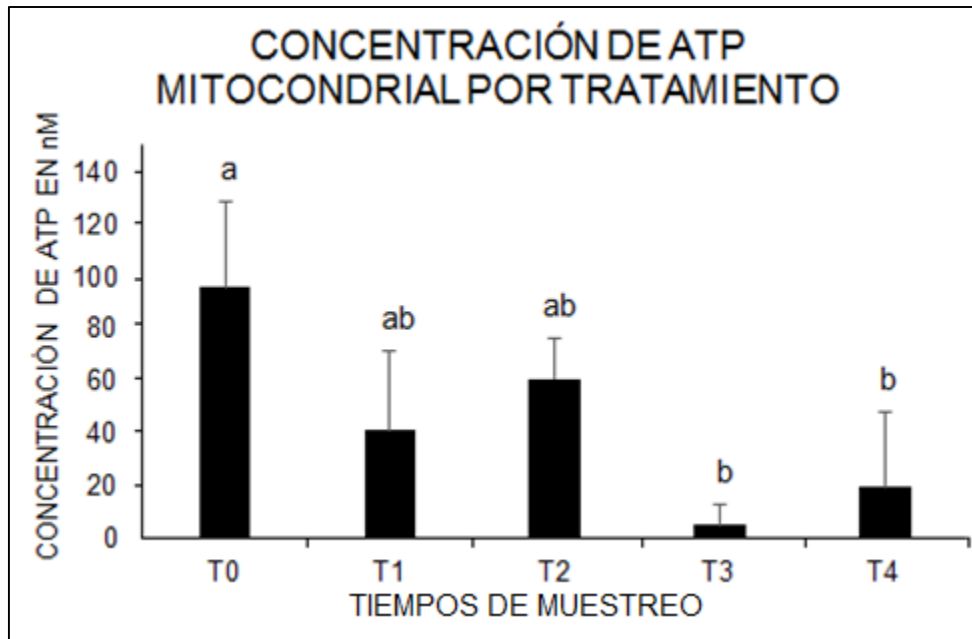


Figura 18. Cuantificación de ATP mitocondrial por tratamiento. Las literales diferentes representan diferencias significativas entre los tratamientos. Cada barra representa la media \pm error estándar (n=3, p<0.05).

Al comparar los niveles de expresión de los transcritos de *LvANT* (Figura 17) con la cantidad de ATP mitocondrial (Figura 18), se observó que al aumentar la expresión de *LvANTX* la cantidad de ATP dentro de la mitocondria disminuyó, tal es el caso de los tiempos de muestreo T1 y T3. Por otro lado, se observó que al disminuir la expresión del transcrito *LvANT2* en el tiempo T1, la cantidad de ATP mitocondrial también disminuye, seguido de esto, en el tiempo T2 hay un aumento tanto en la expresión de *LvANT2* como en la cantidad de ATP. Además, en el tiempo T3 ambos niveles disminuyen y en el tiempo T4 aumentan. Al observar que la expresión de *LvANTX* aumenta drásticamente en el T3 y la cantidad de ATP es la más baja en este mismo tiempo se sugiere que la *LvANTX* esta translocando el ATP de la mitocondria hacia el interior de la célula.

En un estudio realizado por Stepien y col. (1992) sugieren que la isoforma ANT1 de músculo de mamíferos es la responsable de translocar rápidamente ATP fuera de la mitocondria cuando existe alta demanda energética como lo es la diferenciación celular, ya que los autores relacionaron el incremento del transcrito de ANT1 con el nivel de los transcritos de algunas subunidades de la ATP sintasa.

Por otra parte, en este estudio se sugiere que el aumento de la expresión de *LvANT2* está relacionado con el ligero aumento de ATP en el tiempo T4. Esto se debe a que hay reportes que indican que la isoforma ANT2 de humano es la que se encarga de suministrar a la mitocondria de ATP proveniente de la glucólisis, para el metabolismo mitocondrial y la replicación del ADN mitocondrial (Lunardi y Attardi, 1999). Cabe destacar que necesario corroborar estos resultados con técnicas como expresión de genes en tiempo real, actividad de la proteína, entre otros.

La supervivencia de estos organismos después de exponerlos grandes periodos de ejercicio y ayuno, se puede deber a que cuando hay alta demanda de ATP y esta última sobrepasa la velocidad de la fosforilación oxidativa, entran en acción otros mecanismos, como la hidrólisis de fosfágenos en primer lugar, seguido de la glucólisis anaerobia (Hill y col., 2004).

En estudios realizados con el langostino *Cherax destructor* cuando eran expuestos a ejercicio prolongado (15 h), se observó una disminución en la concentración de ATP en músculo mientras que la cantidad de ADP y AMP aumentaban. Además, aumentaba la concentración de lactato y arginina, mientras que el glucógeno muscular y la arginina fosfato disminuían. Los autores reportaron que durante el ejercicio prolongado el tejido muscular de *C. destructor* activaba a glucólisis anaerobia y los niveles de ATP que se generaban eran para mantener a la célula funcionando. Esto último era debido a un aumento en la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) por activación de la glucólisis anaerobia y arginina cinasa presente en el músculo de este organismo (England y Baldwin, 1983).

La producción de ATP mediante la glucólisis anaerobia es menos eficiente que la aerobia, ya que solo se producen 2 ATP por molécula de glucosa. En este metabolismo ocurre la reducción del piruvato a lactato mediante la enzima LDH, al mismo tiempo que esta oxida el NADH a NAD⁺. El NAD⁺ vuelve a ser utilizado por la glucólisis para ser reducido nuevamente a NADH y volver a usarse en la síntesis de lactato (Lehninger y col., 2000). Por otro lado, en crustáceos, la enzima arginina cinasa es la encargada de desfosforilar a la molécula de arginina fosfato para la producción de ATP, mecanismo que se conoce como hidrólisis de fosfágenos. Este mecanismo provee ATP de manera muy rápida, pero en un corto periodo de tiempo (Mathews y col., 2002).

La presencia de la enzima arginina cinasa en el camarón blanco *L. vannamei* fue reportada por García-Orozco y col. (2007), y posteriormente Martínez-Cruz y col. (2012) observaron que los niveles de ATP se mantuvieron estables en el músculo del camarón cuando los organismos fueron expuestos a diferentes tiempos de hipoxia (baja concentración

de oxígeno disuelto en agua). Los autores sugirieron que la enzima arginina cinasa presente en el músculo del camarón era la responsable de mantener estable la cantidad de ATP en el músculo cuando los camarones estuvieron en hipoxia.

Modelación in silico de LvANTX y LvANT2 de *Litopenaeus vannamei*

La modelación *in silico* de las isoformas LvANTX y LvANT2 del camarón blanco se hizo con base en la estructura cristalizada de ANT de *Bos taurus* (PDB: 1OKC). Se puede observar que tanto LvANTX como LvANT2 presentan seis hélices alfa transmembranales (H1, H2, H3, H4, H5 y H6), mientras que en color negro se indica el motivo **RRRMMM** (figura 19a y 19b). Además, ambas estructuras cuentan con tres hélices alfa superficiales, orientadas hacia la matriz mitocondrial (h12, h34 y h56), mientras que sus extremos N-terminal y C-terminal orientados hacia el espacio intermembrana, como se muestra en las figuras 19c para LvANTX y 19d para LvANT2.

Todos los miembros de la MCF presentan los motivos **PxD/ExxK/RxK/R** (x puede ser cualquier aminoácido) en las hélices H1, H3 y H5, o hélices impares (Pebay-Peyroula y col., 2003). Se puede observar que, en el caso de las ANT del camarón, estos motivos se encuentran en los residuos de prolina P30, P135 y P232 de la cadena de aminoácidos (figuras 19e y 19f). Estos resultados concuerdan con los descritos por Pebay-Peyroula y col. (2003) en donde cristalizaron la isoforma ANT1 de *B. taurus* y observaron la presencia de estos tres motivos de prolina.

En las Figuras 20a y 20b se resaltan los residuos que se han reportado como los responsables de la actividad del transporte de los nucleótidos. En ambas isoformas del camarón estos residuos corresponden a las argininas R82, R190, R237, R238 y R282, y la lisina K25. De acuerdo a lo reportado para la secuencia de bovino, los residuos para el anclaje de nucleótidos son R79, R187, R235, R236, R279 y K22 (Pebay-Peyroula y col., 2003). Además de la unión de nucleótidos de adenina, se ha reportado que ANT es capaz de unir los nucleótidos de guanina GDP y GTP, en el mismo sitio que une ADP y ATP. Esta capacidad también se ha observado en las proteínas desacoplantes (UCPs) presentes en las mitocondrias de ardillas, por lo que se han clasificado dentro de la misma súper familia de los acarreadores de solutos mitocondriales (Krauss y col., 2005; Vercesi y col., 2006; Komelina y Amerkhanov, 2010; Montalvo y Palmieri, 2012).

La distribución espacial de las cargas de los residuos de aminoácidos *LvANTX* y *LvANT2* se muestra en las figuras 20c y 20d, observándose la distribución de cargas positivas (rojo) y negativas (azul) son similares en ambas isoformas. Además de acuerdo a los modelos predictivos obtenidos, se puede observar que las cargas positivas se distribuyen mayormente en el canal que se forma en el interior de la ANT desde el espacio intermembrana hasta la matriz mitocondrial, teniendo mayor capacidad de translocar los nucleótidos de purina debido a que estos tienen cargas negativas (Figura 19e y 19f) (Pebay-Peyroula y col., 2003).

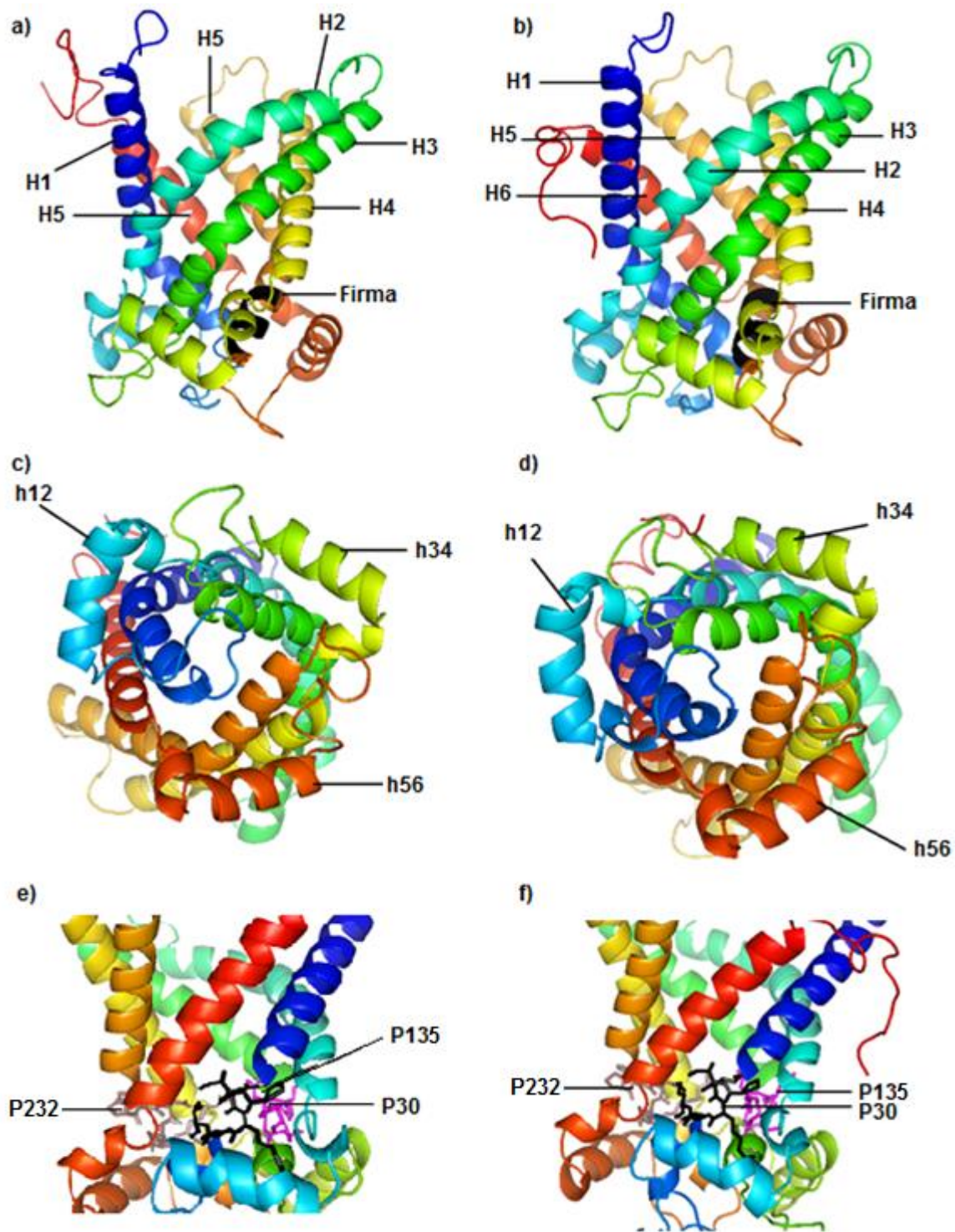


Figura 19. Comparación de modelos proteicos predictivos de LvANTX (19a, 19c y 19e) y LvANT2 (19b, 19d y 19f).

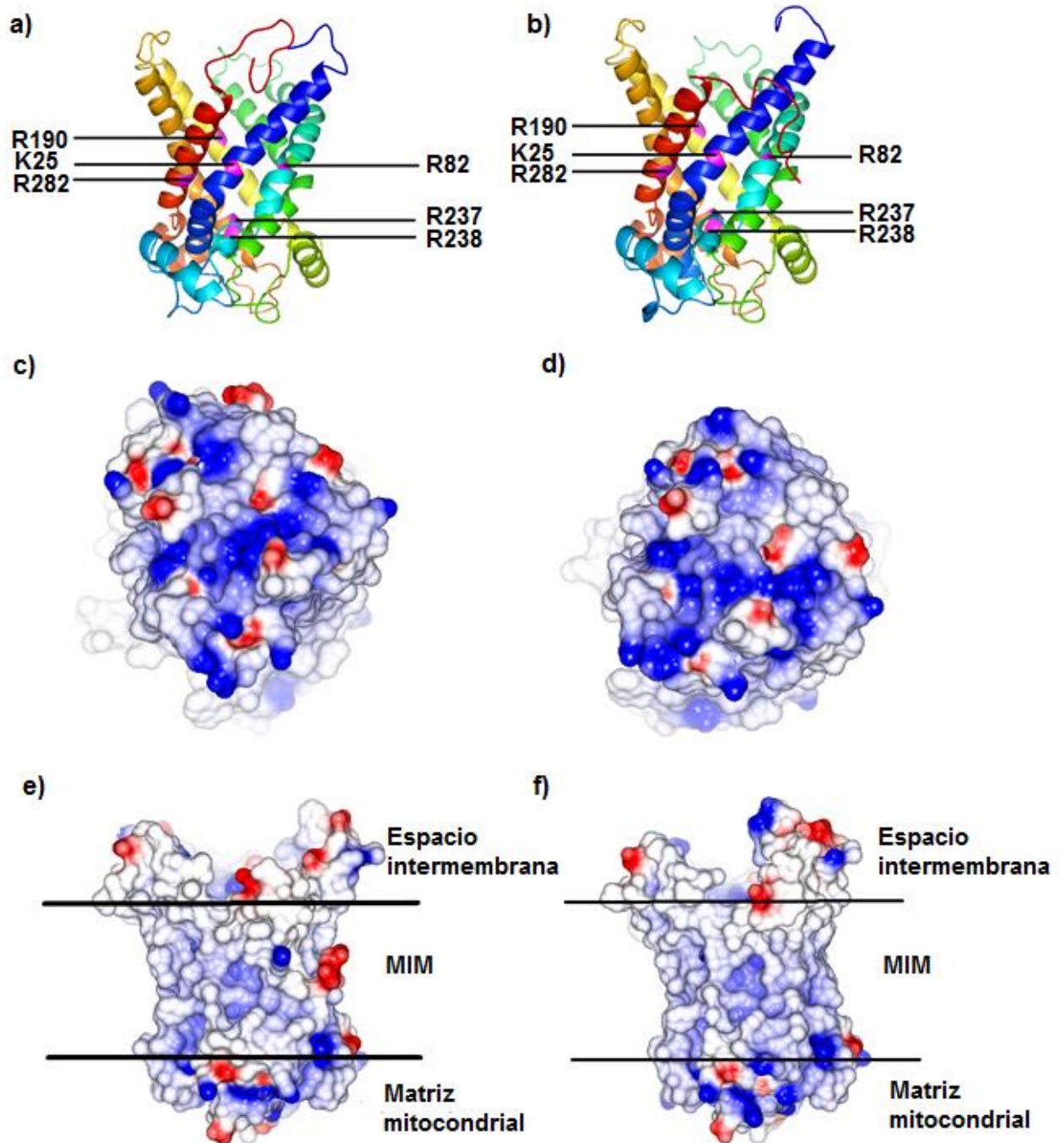


Figura 20. Comparación de modelos proteicos predictivos de *LvANTX* y *LvANT2*. a) sitios de unión a nucleótidos de adenina de *LvANTX*, b) sitios de unión a nucleótidos de adenina de *LvANT2*; c) y e) distribución espacial de cargas en *LvANTX*; d) y f) distribución espacial de cargas en *LvANT2* (cargas positivas en azul, y negativas en rojo).

En la Figura 21 se muestra el traslape de los modelos proteicos predictivos de *LvANTX* y *LvANT2*. Se observó que las estructuras de las dos isoformas son muy similares entre sí, y que la mayor diferencia se puede apreciar en los extremos N-terminal y C-terminal. El lazo ubicado en el extremo N-terminal de *LvANTX* mantiene la misma longitud que el de *LvANT2*, la única diferencia radica en los residuos de aminoácidos glicina (G2) y alanina (A4) de *LvANTX* que son diferentes a los aminoácidos de serina (S2) y glicina (G4) de *LvANT2*. Aunque ambas isoformas tienen la misma naturaleza química, la orientación del extremo N-terminal de *LvANTX* se encuentra más próximo a la hélice alfa transmembranal H1. Por otro lado, la orientación del extremo C-terminal de cada isoforma es diferente, ya que el extremo C-terminal de *LvANT2* se encuentra más cercano a la membrana interna mitocondrial y el de *LvANTX* se localiza hacia el espacio intermembrana.

En cuanto al canal que se forma en el interior de la proteína desde el espacio intermembrana hacia la matriz mitocondrial, no se observaron diferencias en el tamaño o distribución de las hélices alfa. Sin embargo, cabe resaltar que estos modelos son predictivos y si bien se puede tener un acercamiento de la estructura y conformación espacial, es necesario hacer estudios cristalográficos para confirmar o no los resultados.

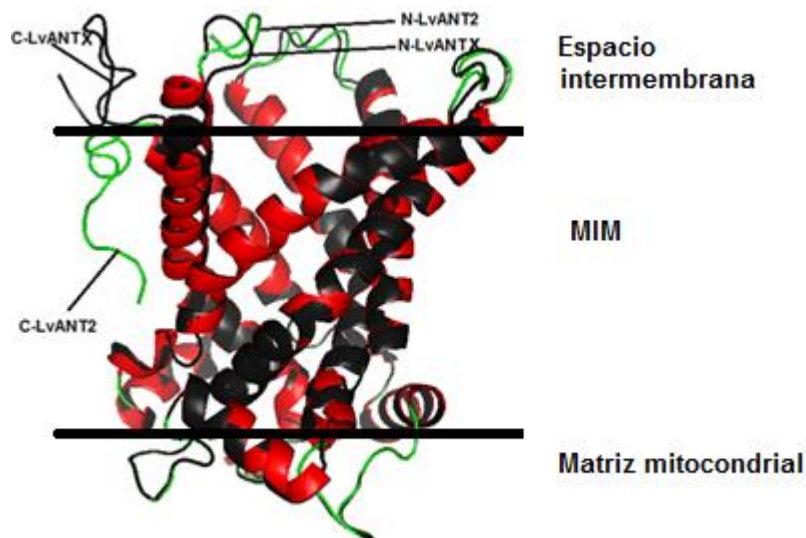


Figura 21. Alineamiento de las estructuras proteicas predictivas de *LvANTX* (color negro) y *LvANT2* (color rojo). En color verde se resaltan los lazos de *LvANT2*.

Por otro lado, se compararon las isoformas *LvANTX* y *LvANT2* con la ANT1 de *B. taurus* (PDB: 1OKC), cuyo modelo cristalográfico fue definido por Pebay-Peyroula y col. (2003). Al realizar un traslape de los modelos predictivos de las isoformas de ANT de *L. vannamei* con el modelo confirmado de *B. taurus*, se observó que las isoformas del camarón son muy similares a la de bovino, con excepción de los extremos N-terminal y C-terminal, que se observan en la Figura 22a. Halestrap y Brenner (2003) mencionaron que las proteínas acarreadoras mitocondriales carecen de orientación en el extremo N-terminal, a diferencia de las proteínas de la matriz mitocondrial y otras ubicadas en la MIM. Esto se pudo corroborar realizando un traslape de las secuencias deducidas de aminoácidos de las isoformas de ANT de *L. vannamei* con ANT de crustáceos como *Marsupenaeus japonicus* (ABN04118.1), *Portunus trituberculatus* (AJG36410.1), *Penaeus monodon* (AFK93891.1), *Artemia franciscana* (ADO32616.1) y *Pacifastacus lenisculus* (ABI34072.1) (Figura 22b), donde se pudo observar que todas las estructuras son muy similares, pero los extremos N-terminal y C-terminal son propios para cada proteína de cada especie.

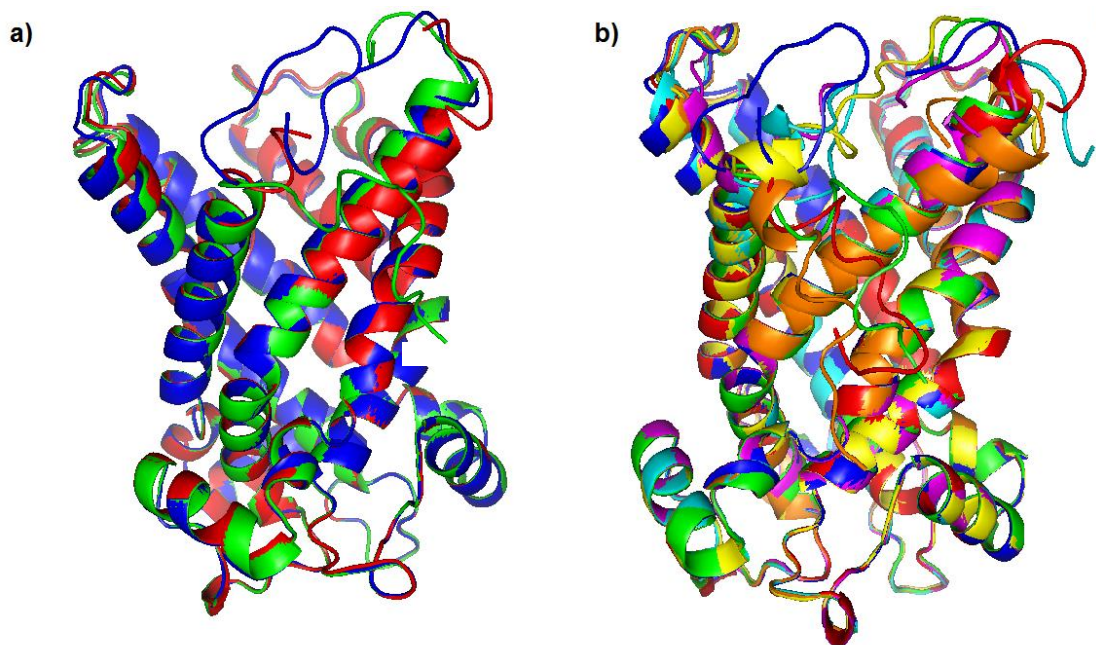


Figura 22. a) Alineamiento de estructuras proteicas de ANT1 de *B. taurus* (rojo), *LvANTX* (azul) y *LvANT2* (verde). b) Alineamiento de estructuras proteicas predictivas de ANT de *Marsupenaeus japonicus* (rojo), *Portunus trituberculatus* (amarillo), *Penaeus monodon* (naranja), *Artemia franciscana* (magenta), *Pacifastacus lenisculus* (cyan), *LvANTX* (azul) y *LvANT2* (verde),

Relaciones Filogenéticas de las isoformas de ANT en *L. vannamei*

Las relaciones filogenéticas de *LvANTX* y *LvANT2* se realizaron utilizando las secuencias aminoacídicas correspondientes a las isoformas de ANT1, ANT2 y ANT3 de diversos organismos tanto vertebrados como invertebrados. Para la construcción del árbol se usaron 28 secuencias de aminoácidos de las cuales 10 fueron de mamíferos, ocho de crustáceos (incluyendo *LvANTX* y *LvANT2*), ocho de insectos, y como ancestros en común se utilizaron las secuencias del nemátodo, *Caenorhabditis elegans* y la levadura, *Saccharomyces cerevisiae*.

De acuerdo al alineamiento de las secuencias de aminoácidos de *LvANTX* y *LvANT2* con a las isoformas de ANT de las especies utilizadas para el análisis filogenético, ANT pertenece a la familia de acarreadores mitocondriales (MCF) y es altamente conservada desde los hongos hasta los mamíferos como puede observarse en las Tablas 3 y 4. *LvANTX* obtuvo el menor porcentaje de identidad cuando se comparó el ANT de *S. cerevisiae* obteniendo el 52 % y con *C. elegans* el 54 %, mientras que para *LvANT2* fue del 71 % y 72 % para *S. cerevisiae* y *C. elegans* respectivamente. Además, se puede observar que al comparar las isoformas de ANT del camarón con las especies de insectos que se seleccionaron para el análisis, el porcentaje de identidad aumentó desde el 75 % hasta el 84 % (Tabla 3 y 4).

Al hacer la comparación con los crustáceos, se observó que el porcentaje de identidad aumentó tanto para *LvANTX* como *LvANT2*, desde el 90 hasta el 97 %, a excepción de la secuencia de ANT del crustáceo *Artemia franciscana* que fue el 80 % (Tabla 3 y 4). Estos resultados concuerdan con un análisis filogenético previo realizado por Santamaria y col. (2004), quienes estudiaron la evolución de la familia de los translocadores ANT en más de 40 especies encontrando que, efectivamente hay una alta identidad del translocador de nucleótidos de adenina entre las especies, sugiriendo que se debe a la importante función que tiene esta molécula en el metabolismo celular.

Comparando las isoformas de ANT de mamíferos con las del camarón, se puede observar que *LvANTX* obtuvo mayor porcentaje de identidad con la isoforma ANT1 del bovino (*Bos Taurus*), de humano (*Homo sapiens*), del ratón (*Mus musculus*) y la rata (*Rattus norvegicus*), por lo que podría sugerirse que *LvANTX* del camarón reportada por Ma y col. (2014) corresponde a la isoforma ANT1 de acuerdo a este análisis. Por otro lado al comparar *LvANT2* con las isoformas de los mamíferos se observó que tiene mayor porcentaje de

identidad tanto con la isoforma de ANT2 y ANT3, concordando con los resultados de Santamaria y col. (2004), en donde indican que estas dos isoformas son más similares entre sí teniendo menor divergencia filogenética entre ellas con respecto a la isoforma de ANT1.

En el árbol de distancias genéticas se observa que las isoformas ANT1, ANT2 y ANT3 de mamíferos se agruparon en un mismo clado del árbol filogenético (figura 22, líneas en azul). En el cladograma se muestra que las isoformas ANT2 y ANT3 en mamíferos se ubicaron en un mismo clado en comparación a lo obtenido para las ANT1 de estos mismos; esto se debe a que hay una mayor identidad entre las isoformas ANT2 y ANT3, que con la isoforma de ANT1 en todas las especies (Santamaria y col. (2004). Por otro lado, la proteína deducida de *LvANTX* y *LvANT2* se encuentran en el mismo clado donde se agruparon las especies correspondientes a los crustáceos (Figura 23, líneas en verde), mientras que hubo una separación en el clado de los insectos (Figura 23, líneas en rojo), aun cuando estas dos especies pertenecen a los artrópodos.

Particularmente, se observó, aunque *A. franciscana* es un crustáceo, la secuencia de ANT se separó de este grupo. Esta lejanía filogenética (Figura 23) así como el bajo porcentaje de identidad de ANT de *Artemia* comparada con el resto de los crustáceos (Tabla 3 y 4) puede deberse que *A. franciscana* es un crustáceo perteneciente a la clase de los branquiópodos, a diferencia de *Marsupenaeus japonicus*, *Pacifastacus leniusculus*, *Penaeus monodon*, *Portunus trituberculatus* y *Scylla paramamosain* que son decápodos al igual que *L. vannamei*.

Debido a la importancia de ANT en el metabolismo celular, esta proteína se encuentra muy conservada en todas las especies, especialmente los tres dominios característicos de las proteínas pertenecientes a la MCF, y que posiblemente surgieron a partir de un evento de duplicación de genes generado antes de los hongos, debido a que son los que se encuentran más alejados en el cladograma (Santamaria y col. 2004). Existen reportes más recientes que indican que esta duplicación de genes se siguió dando en ANT hasta dar origen a las que se conocen como proteínas desacoplantes (UCP, por sus siglas en inglés) (Sokolova y Sokolov, 2005; Emre y col., 2007). Las UCPs de *L. vannamei* han sido estudiadas recientemente en los tejidos del camarón, demostrando la presencia de estas proteínas en los crustáceos, y de acuerdo al análisis filogenético las secuencias de UCPs de *L. vannamei* enraízan con las de ANT (datos no publicados de Mendez-Romero, 2016).

Tabla 3. Comparación de la secuencia de aminoácidos de LvANTX con la secuencia de ANT de otras especies.

ID Genbank	Nombre científico	Nombre común	Identidad
Mamíferos			
NP_777083.1	<i>Bos taurus</i> isoforma 1	Bovino	82 %
NP_777084.1	<i>Bos taurus</i> isoforma 2	Bovino	80 %
NP_777085.1	<i>Bos taurus</i> isoforma 3	Bovino	81 %
AAA61223.1	<i>Homo sapiens</i> isoforma 1	Humano	81 %
NP_001143.2	<i>Homo sapiens</i> isoforma 2	Humano	80 %
NP_001627.2	<i>Homo sapiens</i> isoforma 3	Humano	81 %
NP_031476.3	<i>Mus musculus</i> isoforma 1	Ratón común	83 %
NP_031477.1	<i>Mus musculus</i> isoforma 2	Ratón común	80 %
NP_445967.1	<i>Rattus norvegicus</i> isoforma 1	Rata común	83 %
NP_476443.1	<i>Rattus norvegicus</i> isoforma 2	Rata común	80 %
Crustáceos			
ADO32616.1	<i>Artemia franciscana</i>	Artemia	80 %
ABN04118.1	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	Camarón kuruma	92 %
ABI34072.1	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Cangrejo de río	91 %
AFK93891.1	<i>Penaeus monodon</i>	Langostino jumbo	91 %
AJG36410.1	<i>Portunus trituberculatus</i>	Cangrejo azul	91 %
AHC54390.1	<i>Scylla paramamosain</i> isoforma 2	Cangrejo	92 %
Insectos			
AET74069.1	<i>Apis cerana</i>	Abeja	80 %
NP_001037072.1	<i>Bombyx mori</i>	Gusano de seda	82 %
NP_511110.1	<i>Drosophila melanogaster</i> isoforma 2	Mosca	75 %
AAY66852.1	<i>Ixodes scapularis</i>	Garrapata	82 %
NP_001298479.1	<i>Papilio polytes</i>	Mariposa	82 %
NP_001293047.1	<i>Plutella xylostella</i>	Polilla	78 %
KFM79062.1	<i>Stegodyphus mimosarum</i>	Araña	83 %
BAR13244.1	<i>Tetranychus urticae</i>	Ácaro	76 %
Raíz de árbol			
NP_001022799.1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Nemátodo	71 %
NP_009642.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levadura	52 %

Tabla 4. Comparación de la secuencia de aminoácidos de LvANT2 con la secuencia de ANT de otras especies.

ID Genbank	Nombre científico	Nombre común	Identidad
Mamíferos			
NP_777083.1	<i>Bos taurus</i> isoforma 1	Bovino	82 %
NP_777084.1	<i>Bos taurus</i> isoforma 2	Bovino	82 %
NP_777085.1	<i>Bos taurus</i> isoforma 3	Bovino	83 %
AAA61223.1	<i>Homo sapiens</i> isoforma 1	Humano	80 %
NP_001143.2	<i>Homo sapiens</i> isoforma 2	Humano	82 %
NP_001627.2	<i>Homo sapiens</i> isoforma 3	Humano	82 %
NP_031476.3	<i>Mus musculus</i> isoforma 1	Ratón común	81 %
NP_031477.1	<i>Mus musculus</i> isoforma 2	Ratón común	83 %
NP_445967.1	<i>Rattus norvegicus</i> isoforma 1	Rata común	81 %
NP_476443.1	<i>Rattus norvegicus</i> isoforma 2	Rata común	82 %
Crustáceos			
ADO32616.1	<i>Artemia franciscana</i>	Artemia	80 %
ABN04118.1	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	Camarón kuruma	97 %
ABI34072.1	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Cangrejo de río	89 %
AFK93891.1	<i>Penaeus monodon</i>	Langostino jumbo	97 %
AJG36410.1	<i>Portunus trituberculatus</i>	Cangrejo azul	91 %
AHC54390.1	<i>Scylla paramamosain</i> isoforma 2	Cangrejo	91 %
Insectos			
AET74069.1	<i>Apis cerana</i>	Abeja	81 %
NP_001037072.1	<i>Bombyx mori</i>	Gusano de seda	82 %
NP_511110.1	<i>Drosophila melanogaster</i> isoforma 2	Mosca	75 %
AAY66852.1	<i>Ixodes scapularis</i>	Garrapata	84 %
NP_001298479.1	<i>Papilio polytes</i>	Mariposa	81 %
NP_001293047.1	<i>Plutella xylostella</i>	Polilla	77 %
KFM79062.1	<i>Stegodyphus mimosarum</i>	Araña	82 %
BAR13244.1	<i>Tetranychus urticae</i>	Ácaro	78 %
Raíz del árbol			
NP_001022799.1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Nemátodo	72 %
NP_009642.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levadura	54 %

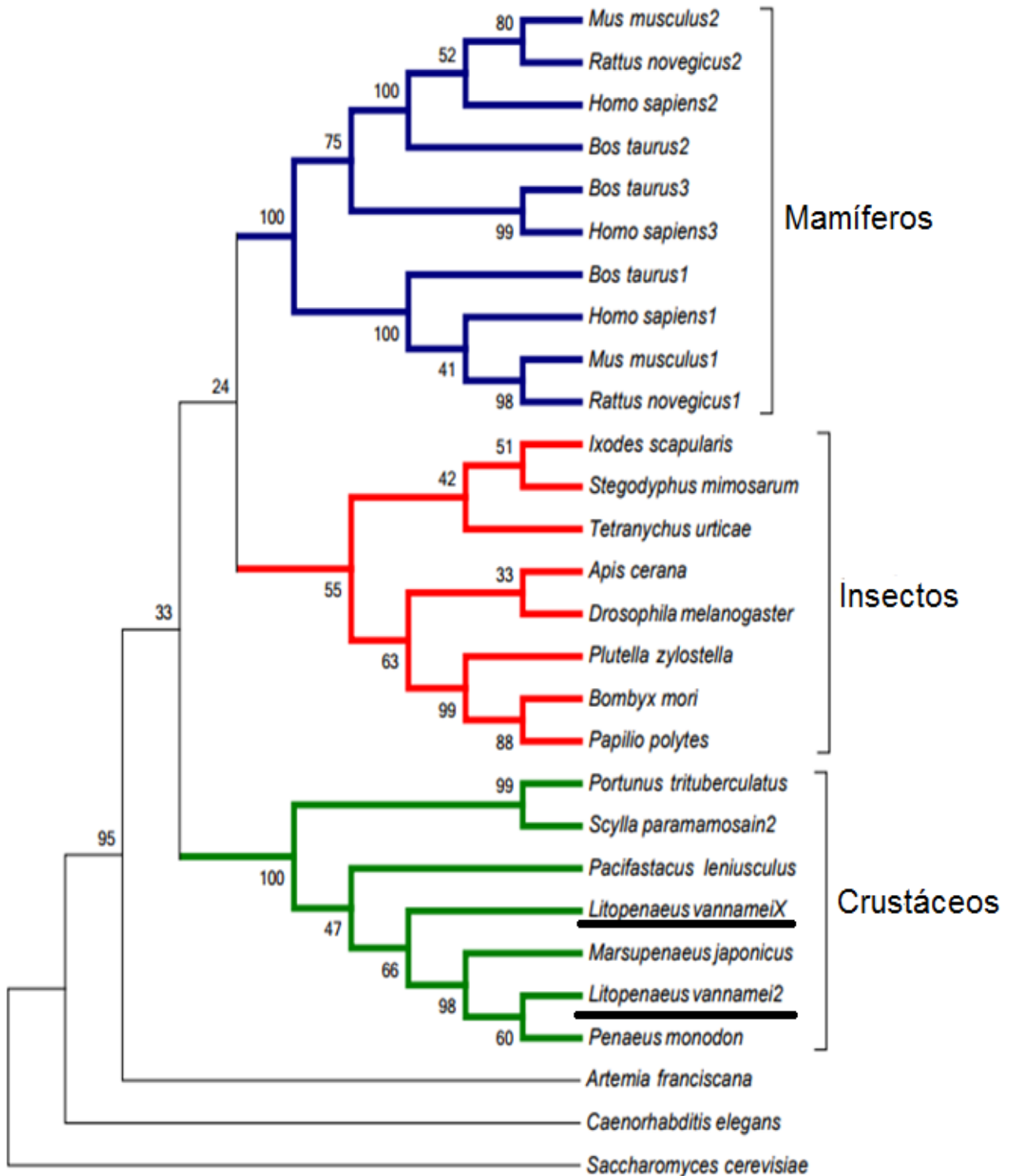


Figura 23. Árbol filogenético de la proteína mitocondrial ANT. Construido utilizando el método Neighbor- Joining o del vecino más cercano. Los números de los nodos indican porcentajes de réplicas.

CONCLUSIONES

Se determinó la expresión génica semi-cuantitativa de las isoformas *LvANTX* y *LvANT2* durante condiciones de ayuno y ejercicio durante un periodo de tiempo prolongado, simulando las condiciones a las que se podría enfrentar el camarón blanco en algunos de los estadios de su ciclo de vida al migrar del mar abierto a los esteros. La expresión de *LvANTX* fue mayor durante las primeras 12 h de ejercicio y disminuyó ligeramente al cumplir las 16 h, aumentando así en este último los transcritos de *LvANT2*. Se sugiere que la isoforma *LvANTX* se encarga de translocar ATP fuera de la mitocondria de los camarones, y *LvANT2* transloca ATP dentro de la mitocondria, convirtiéndola en un consumidor de ATP en condiciones de ejercicio constante, manteniendo estables los niveles de ATP mitocondrial.

Los análisis bioinformáticos y estructurales de las secuencias de aminoácidos de ANT confirmaron que ambas isoformas de ANT, *LvANTX* y *LvANT2*, cuentan con los dominios y características específicas conservadas para los translocadores de nucleótidos y para los miembros de la MCF. Los porcentajes de identidad obtenidos de la comparación de las isoformas de ANT de mamíferos con la *LvANTX* del camarón, sugiere que esta isoforma puede tratarse de la isoforma ANT1, mientras que el análisis filogenético muestra que las isoformas del camarón están ampliamente relacionadas con las ANT de los artrópodos, en especial las de crustáceos, confirmando que ANT es una proteína sumamente conservada en todas las especies incluidas en este estudio.

RECOMENDACIONES

- Evaluar la expresión de los genes de *LvANTX* y *LvANT2* mediante PCR en tiempo real.
- Cuantificar las isoformas *LvANTX* y *LvANT2* del camarón, mediante un ensayo de ligandos ELISA con anticuerpos específicos previamente obtenidos.
- Evaluar las concentraciones de ATP en plasma para evidenciar cuánta concentración de ATP se encontraba por otras vías.
- Cuantificar lactato en plasma para saber si los camarones se encontraban en condiciones de hipoxia.
- Realizar modelos cristalográficos de *LvANTX* y *LvANT2*, y confirmar las diferencias estructurales.

BIBLIOGRAFÍA

- ALBERTS, B. J., LEWIS, A., RAFF, J., ROBERTS, M., WALTER, K., ALBERTS, P., FERRERAS GOMEZ, M. G. S., MANUEL, J., SALVAT QUESADA, M. T. L. & DIAZ FERNANDEZ, E. G. L. 2008. *Biología molecular de la célula*, e-libro, Corp.
- ANWAR, M., KASPER, A., STECK, A. R. & SCHIER, J. G. 2017. Bongkrekitic Acid—a Review of a Lesser-Known Mitochondrial Toxin. *Journal of Medical Toxicology*, 1-7.
- ARBOLEDA, G. 2008. Mitocondria y muerte celular. *NOVA*, 6.
- ARNOLD, K., BORDOLI, L., KOPP, J. & SCHWEDE, T. 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22, 195-201.
- BAECHLE, T. R. & EARLE, R. W. 2007. *Principios del entrenamiento de la fuerza y del acondicionamiento físico*, Ed. Médica Panamericana.
- BANGSBO, J., KRISTRUP, P., GONZÁLEZ-ALONSO, J. & SALTIN, B. 2001. ATP production and efficiency of human skeletal muscle during intense exercise: effect of previous exercise. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 280, E956-E964.
- BARATH, P., LUCIAKOVA, K., HODNY, Z., LI, R. & NELSON, B. D. 1999. The growth-dependent expression of the adenine nucleotide translocase-2 (ANT2) gene is regulated at the level of transcription and is a marker of cell proliferation. *Experimental cell research*, 248, 583-588.
- BOOTH, F. W. & NEUFER, P. D. 2005. Exercise controls gene expression. *American Scientist*, 93, 28-35.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248-254.
- CASTILLE, F., SAMOCHA, T., LAWRENCE, A., HE, H., FRELIER, P. & JAENIKE, F. 1993. Variability in growth and survival of early postlarval shrimp (*Penaeus vannamei* Boone 1931). *Aquaculture*, 113, 65-81.
- CROMPTON, M. 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochemical Journal*, 341, 233-249.
- CHEN, C., KO, Y., DELANNOY, M., LUDTKE, S. J., CHIU, W. & PEDERSEN, P. L. 2004. Mitochondrial ATP Synthasome THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE BY ELECTRON MICROSCOPY OF THE ATP SYNTHASE IN COMPLEX FORMATION

- WITH CARRIERS FOR Pi AND ADP/ATP. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 31761-31768.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*, 162, 156-159.
- DA ROSA, J. G. S., BARCELLOS, H. H. D. A., IDALENCIO, R., MARQUEZE, A., FAGUNDES, M., ROSSINI, M., VARIANI, C., BALBINOTI, F., TIETBÖHL, T. M. H. & ROSEMBERG, D. B. 2016. Just Keep Swimming: Neuroendocrine, Metabolic, and Behavioral Changes After a Forced Swimming Test in Zebrafish. *Zebrafish*.
- DOERNER, A., PAUSCHINGER, M., BADORFF, A., NOUTSIAS, M., GIESSEN, S., SCHULZE, K., BILGER, J., RAUCH, U. & SCHULTHEISS, H.-P. 1997. Tissue-specific transcription pattern of the adenine nucleotide translocase isoforms in humans. *FEBS letters*, 414, 258-262.
- EMRE, Y., HURTAUD, C., RICQUIER, D., BOUILLAUD, F., HUGHES, J. & CRISCUOLO, F. 2007. Avian UCP: the killjoy in the evolution of the mitochondrial uncoupling proteins. *Journal of molecular evolution*, 65, 392-402.
- ENGLAND, W. & BALDWIN, J. 1983. Anaerobic energy metabolism in the tail musculature of the Australian yabby *Cherax destructor* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae): role of phosphagens and anaerobic glycolysis during escape behavior. *Physiological Zoology*, 614-622.
- EPIFANIO, C. E. & COHEN, J. H. 2016. Behavioral adaptations in larvae of brachyuran crabs: A review. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 482, 85-105.
- FARFANTE, I. P. 1988. Illustrated key to penaeoid shrimps of commerce in the Americas.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 783-791.
- FOFONOFF, P., RUIZ, G., STEVES, B., HINES, A. & CARLTON, J. 2003. National Exotic Marine and Estuarine Species Information System (NEMESIS). URL <http://invasions.si.edu/nemesis>.
- GARCÍA-OROZCO, K. D., AISPURO-HERNÁNDEZ, E., YEPIZ-PLASCENCIA, G., CALDERÓN-DE-LA-BARCA, A. M. & SOTELO-MUNDO, R. R. 2007. Molecular characterization of arginine kinase, an allergen from the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *International archives of allergy and immunology*, 144, 23-28.
- GAVALDÀ-NAVARRO, A., VILLENA, J. A., PLANAVILA, A., VINAS, O. & MAMPEL, T. 2014. Expression of Adenine Nucleotide Translocase (ANT) Isoform Genes Is Controlled by

- PGC-1 α Through Different Transcription Factors. *Journal of cellular physiology*, 229, 2126-2136.
- GOUBERT, E., MIRCHEVA, Y., LASORSA, F. M., MELON, C., PROFILO, E., SUTERA, J., BECQ, H., PALMIERI, F., PALMIERI, L. & ANIKSZTEJN, L. 2017. Inhibition of the mitochondrial glutamate carrier SLC25A22 in astrocytes leads to intracellular glutamate accumulation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 149.
- GUCIC, M. 2008. *Digestibilidad in vivo de alimentos comerciales y experimentales para camarón blanco (Litopenaeus vannamei) cultivado a diferentes salinidades*. Tesis de Maestría.
- GUTIÉRREZ-AGUILAR, M., PÉREZ-MARTÍNEZ, X., CHÁVEZ, E. & URIBE-CARVAJAL, S. 2010. In *Saccharomyces cerevisiae*, the phosphate carrier is a component of the mitochondrial unselective channel. *Archives of biochemistry and biophysics*, 494, 184-191.
- HALESTRAP, A. P. 2014. The C ring of the F1Fo ATP synthase forms the mitochondrial permeability transition pore: a critical appraisal. *Frontiers in oncology*, 4, 234.
- HALESTRAP, A. P. & BRENNER, C. 2003. The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Current medicinal chemistry*, 10, 1507-1525.
- HALESTRAP, A. P., KERR, P. M., JAVADOV, S. & WOODFIELD, K.-Y. 1998. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1366, 79-94.
- HAWORTH, R. A. & HUNTER, D. R. 2000. Control of the mitochondrial permeability transition pore by high-affinity ADP binding at the ADP/ATP translocase in permeabilized mitochondria. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 32, 91-96.
- HILL, R. W., WYSE, G. A. & ANDERSON, M. 2004. *Animal physiology*, Sinauer Associates Massachusetts.
- HOFFMANN, B., STÖCKL, A., SCHLAME, M., BEYER, K. & KLINGENBERG, M. 1994. The reconstituted ADP/ATP carrier activity has an absolute requirement for cardiolipin as shown in cysteine mutants. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 1940-1944.
- HUNTER, D. R. & HAWORTH, R. A. 1979. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria: I. The protective mechanisms. *Archives of biochemistry and biophysics*, 195, 453-459.
- JIMENEZ-GUTIERREZ, L., URIBE-CARVAJAL, S., SANCHEZ-PAZ, A., CHIMEO, C. & MUHLIA-ALMAZAN, A. 2014. The cytochrome c oxidase and its mitochondrial

- function in the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* during hypoxia. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 46, 189-196.
- JONES, D. T., TAYLOR, W. R. & THORNTON, J. M. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer applications in the biosciences: CABIOS*, 8, 275-282.
- KELLEY, L. A., MEZULIS, S., YATES, C. M., WASS, M. N. & STERNBERG, M. J. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols*, 10, 845-858.
- KO, Y. H., DELANNOY, M., HULLIHEN, J., CHIU, W. & PEDERSEN, P. L. 2003. Mitochondrial ATP Synthasome Cristae-Enriched Membranes and a Multiwell Detergent Screening Assay Yield Dispersed Single Complexes Containing the ATP Synthase and Carriers for Pi and ADP/ATP. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 12305-12309.
- KOKOSZKA, J. E., WAYMIRE, K. G., LEVY, S. E., SLIGH, J. E., CAI, J., JONES, D. P., MACGREGOR, G. R. & WALLACE, D. C. 2004. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature*, 427, 461-465.
- KOMELINA, N. P. & AMERKHAPOV, Z. G. 2010. A comparative study of the inhibitory effects of purine nucleotides and carboxyatractylate on the uncoupling protein-3 and adenine nucleotide translocase. *Acta Biochimica Polonica*, 57, 413.
- KONRAD, C., KISS, G., TOROCSI, B., ADAM-VIZI, V. & CHINOPOULOS, C. 2012. Absence of Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition but presence of bongkrekate-sensitive nucleotide exchange in *C. crangon* and *P. serratus*. *PLoS ONE*, 7, e39839.
- KONRÁD, C., KISS, G., TÖRÖCSI, B., LÁBÁR, J. L., GERENCSE, A. A., MÁNDI, M., ADAM-VIZI, V. & CHINOPOULOS, C. 2011. A distinct sequence in the adenine nucleotide translocase from *Artemia franciscana* embryos is associated with insensitivity to bongkrekate and atypical effects of adenine nucleotides on Ca²⁺ uptake and sequestration. *FEBS journal*, 278, 822-836.
- KRÄMER, R. 1996. Structural and functional aspects of the phosphate carrier from mitochondria. *Kidney international*, 49, 947-952.
- KRAUSS, S., ZHANG, C.-Y. & LOWELL, B. B. 2005. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6, 248-261.
- KRUGER, N. J. 2009. The Bradford method for protein quantitation. *The protein protocols handbook*, 17-24.

- LAVERACK, M. 1962. Responses of cuticular sense organs of the lobster, *Homarus vulgaris* (Crustacea)—I. Hair-peg organs as water current receptors. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 5, 319-323.
- LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L. & COX, M. M. 2000. *Principios de bioquímica*, Sarvier.
- LEU, J.-H., LIN, S.-J., HUANG, J.-Y., CHEN, T.-C. & LO, C.-F. 2013. A model for apoptotic interaction between white spot syndrome virus and shrimp. *Fish & shellfish immunology*, 34, 1011-1017.
- LEUNG, A. W. & HALESTRAP, A. P. 2008. Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1777, 946-952.
- LEUNG, A. W., VARANYUWATANA, P. & HALESTRAP, A. P. 2008. The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 26312-26323.
- LEVY, S. E., CHEN, Y.-S., GRAHAM, B. H. & WALLACE, D. C. 2000. Expression and sequence analysis of the mouse adenine nucleotide translocase 1 and 2 genes. *Gene*, 254, 57-66.
- LUNARDI, J. AND ATTARDI, G. 1991. Differential regulation of expression of the multiple ADP/ATP translocase genes in human cells. *Journal of Biological Chemistry*, 266(25), 16534-16540.
- MA, F.-F., CHOU, Z.-G., LIU, Q.-H., GUAN, G., LI, C. & HUANG, J. 2014. White spot syndrome virus VP12 interacts with adenine nucleotide translocase of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of invertebrate pathology*, 118, 28-33.
- MADRIGAL, S. R., CONTRERAS, E. V., TORRES, M. P. & HERNÁNDEZ, G. P. 2010. De la bioenergética a la bioquímica del ATP. *ContactoS*, 77, 39-45.
- MARTINEZ-CRUZ, O., DE LA BARCA, A. C., URIBE-CARVAJAL, S. & MUHLIA-ALMAZAN, A. 2012. The function of mitochondrial F₀F₁ ATP-synthase from the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* muscle during hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 162, 107-112.
- MATHEWS, C. K., VAN HOLDE, K. E. & AHERN, K. G. 2002. *Bioquímica*, Pearson Education.
- MCKEE, T., MCKEE, J. R. T. & MCKEE, J. R. 2003. *Bioquímica: la base molecular de la vida*, McGraw-Hill/Interamericana.

- MCNICHOLAS, S., POTTERTON, E., WILSON, K. & NOBLE, M. 2011. Presenting your structures: the CCP4mg molecular-graphics software. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 67, 386-394.
- MENDEZ-ROMERO, O. 2016. *Las proteínas desacoplantes UCP4 y UCP5 del camarón blanco y su posible función durante la hipoxia*. Tesis de maestría.
- MENZE, M. A., HUTCHINSON, K., LABORDE, S. M. & HAND, S. C. 2005. Mitochondrial permeability transition in the crustacean *Artemia franciscana*: absence of a calcium-regulated pore in the face of profound calcium storage. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 289, R68-R76.
- MONTALVO, A. & PALMIERI, F. 2012. Transportadores Mitocondriales: Estructura, Función y Patología. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.
- MUHLIA-ALMAZAN, A. & GARCIA-CARRENO, F. L. 2003. Digestion physiology and proteolytic enzymes of crustacean species of the Mexican Pacific Ocean. *Contributions to the study of east Pacific crustaceans*, 2, 77-91.
- MURDOCK, D.G., BOONE, B.E., ESPOSITO, L.A. AND WALLACE, D.C. 1999. Up-regulation of nuclear and mitochondrial genes in the skeletal muscle of mice lacking the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Journal of Biological Chemistry*, 274(20), 14429-14433.
- NICHOLLS, D. G. & FERGUSON, S. 2013. *Bioenergetics*, Academic Press.
- PANOV, A. V., ANDREEVA, L. & GREENAMYRE, J. T. 2004. Quantitative evaluation of the effects of mitochondrial permeability transition pore modifiers on accumulation of calcium phosphate: comparison of rat liver and brain mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics*, 424, 44-52.
- PEBAY-PEYROULA, E., DAHOUT-GONZALEZ, C., KAHN, R., TRÉZÉGUET, V., LAUQUIN, G. J.-M. & BRANDOLIN, G. 2003. Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature*, 426, 39-44.
- PUENTE, E. 2009. *Respuestas fisiológicas de juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, a condiciones oscilantes de oxígeno disuelto y temperatura*. Tesis de Maestría.
- RIVERA, M. 1998. *Efecto de la salinidad sobre el crecimiento y sobrevivencia en postlarvas y juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1991), bajo condiciones de laboratorio*. Tesis de maestría, Universidad de Colima.

- ROBINSON, A. J., OVERY, C. & KUNJI, E. R. 2008. The mechanism of transport by mitochondrial carriers based on analysis of symmetry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 17766-17771.
- RODIĆ, N., OKA, M., HAMAZAKI, T., MURAWSKI, M. R., JORGENSEN, M., MAATOUK, D. M., RESNICK, J. L., LI, E. & TERADA, N. 2005. DNA methylation is required for silencing of *ant4*, an adenine nucleotide translocase selectively expressed in mouse embryonic stem cells and germ cells. *Stem cells*, 23, 1314-1323.
- ROMANO, F. B., TANG, Y., ROSSI, K. C., MONOPOLI, K. R., ROSS, J. L. & HEUCK, A. P. 2016. Type 3 Secretion translocators spontaneously assemble a hexadecameric transmembrane complex. *Journal of Biological Chemistry*, 291, 6304-6315.
- SAITOU, N. & NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4, 406-425.
- SANTAMARIA, M., LANAVE, C. & SACCONI, C. 2004. The evolution of the adenine nucleotide translocase family. *Gene*, 333, 51-59.
- SHOSHAN-BARMATZ, V., DE PINTO, V., ZWECKSTETTER, M., RAVIV, Z., KEINAN, N. & ARBEL, N. 2010. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Molecular aspects of medicine*, 31, 227-285.
- SIEVERS, F., WILM, A., DINEEN, D., GIBSON, T. J., KARPLUS, K., LI, W., LOPEZ, R., MCWILLIAM, H., REMMERT, M. & SÖDING, J. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*, 7, 539.
- STEPIEN, G., TORRONI, A., CHUNG, A.B., HODGE, J.A. AND WALLACE, D.C. 1992. Differential expression of adenine nucleotide translocator isoforms in mammalian tissues and during muscle cell differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 267(21), 14592-14597.
- SZABÓ, I. & ZORATTI, M. 1993. The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. *FEBS letters*, 330, 201-205.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A. & KUMAR, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30, 2725-2729.
- VERCESI, A. E., BORECKÝ, J., MAIA, I. D. G., ARRUDA, P., CUCCOVIA, I. M. & CHAIMOVICH, H. 2006. Plant uncoupling mitochondrial proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 383-404.
- VOET, D. & VOET, J. G. 2006. *Bioquímica*, Ed. Médica Panamericana.

- YIN, Q., CUI, L., PENG, J., WEI, P., XIE, D., CHEN, X., WANG, Z. & LI, K. 2012. Molecular cloning of LvANT2 gene and its expression pattern by cold induction. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1, 003.
- YOSHIDA, M. 2001. Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. *Annual review of immunology*, 19, 475-496.