

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN
SUPERIOR DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS DE LA VIDA
CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MARINA**

**Evaluación transcriptómica de la respuesta a la exposición a
TCM_{ax} en *Litopenaeus vannamei* ablacionados y no
ablacionados, aclimatados a diferentes temperaturas**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Laura Liliana López Galindo

Ensenada, Baja California, México
2014

Tesis defendida por

Laura Liliana López Galindo

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Director del comité

Dr. Fernando Díaz Herrera
Miembro del Comité

Dra. Ana Denisse Re Araujo
Miembro del Comité

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov
Miembro del Comité

Dra. Paula Pérez Brunius
Miembro del Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
Coordinadora
Posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. Jesús Favela Vara
Director de Estudios de Posgrado

Agosto, 2014

Resumen de la tesis de **Laura Liliana López Galindo**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Evaluación transcriptómica de la respuesta a la exposición a TCM_{áx} en *Litopenaeus vannamei* ablacionados y no ablacionados, aclimatados a diferentes temperaturas

Resumen aprobado por:

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez

Litopenaeus vannamei es una especie económicamente importante y su cultivo se ha extendido a nivel mundial. Para acelerar las tasas de reproducción se han implementado técnicas como la ablación de pedúnculo ocular para inducir la maduración gonadal en criaderos comerciales de camarones peneidos. El pedúnculo ocular contiene un complejo sistema neuroendocrino, el cual involucra elementos reguladores que le permiten responder a factores externos como la temperatura, salinidad, estrés, entre otros, mediante el ajuste de sus funciones vitales. En este estudio se evaluó el efecto de la ablación en branquia de *Litopenaeus vannamei* ablacionados y no ablacionados aclimatados a 20, 26 y 32°C, los cuales fueron sometidos a estrés térmico agudo a través de un análisis transcriptómico de genes involucrados en procesos como la regulación iónica y permeabilidad membranal, hipoxia y estrés térmico. Se obtuvieron valores de temperatura crítica máxima en un rango de 33.3-41.4°C. Mediante la validación de genes de referencia realizada se utilizaron los genes *L8* y *Ef1 α* para la normalización de los genes blanco (*Hsp70*, *Hsp90*, *Hif1 α* y *Na⁺/K⁺ATPasa*). De acuerdo con los valores obtenidos de expresión relativa normalizada se encontró que la ablación induce la expresión del gen *Hsp70* en organismos sometidos a estrés térmico agudo, independientemente de la temperatura de aclimatación. El gen *HSP90* mantuvo niveles bajos y estables de expresión bajo las temperaturas de aclimatación de 20 y 26°C en organismos sometidos a estrés térmico agudo. Sin embargo, en organismos experimentales aclimatados a 32°C se obtuvo una expresión significativa de este gen y al adicionar el efecto de la ablación, la expresión se vio sobre expresada a niveles más altos. El gen *Hif1 α* mostró una mayor expresión en organismos control que en organismos experimentales. Y para el caso del gen *Na⁺/K⁺ATPasa* se observó una sobre expresión del gen, aunque no se presentaron diferencias significativas en la expresión del mismo. De acuerdo con los niveles de expresión de los genes *Hif1 α* y *Na⁺/K⁺ATPasa* se encontró que posiblemente existe un efecto de corregulación entre estos genes debido a la función que desempeñan. En general la regulación de la expresión de los genes evaluados en este trabajo, se vio afectada en los organismos ablacionados, lo cual indica que la eliminación de parte del sistema neuroendocrino de *L. vannamei* debido a la ablación, causa un desbalance energético y una des-regulación de los genes en los organismos expuestos a estrés térmico, los cuales se encuentran participando en procesos de osmoregulación, hipoxia y estrés térmico.

Palabras clave: **Expresión de genes, Proteínas de choque térmico, hipoxia, regulación iónica, estrés térmico y PCR tiempo real.**

Abstract of the thesis presented by **Laura Liliana López Galindo** as a partial requirement to obtain the Master in Science degree in Life Science with orientation in Marine Biotechnology.

Transcriptomic assessment of the exposure to CTMax in ablated and non ablated *Litopenaeus vannamei*, acclimated at different temperatures.

Abstract approved by:

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez

Litopenaeus vannamei is an economically important species and its farming has spread worldwide. Nevertheless, some techniques as the eyestalk ablation have been implemented to induce gonadal maturation in commercial hatcheries of penaeid shrimp, hence accelerating their reproduction rates. The shrimp eyestalk contains a complex neuroendocrine system, which involves regulatory elements that allow to respond to external factors such as temperature, salinity, stress, by adjusting its vital functions. On this study, the ablation effect was determined from gills samples of both ablated and non ablated *L. vannamei*, acclimated at 20, 26 and 32°C, and exposed to acute thermal stress to obtain the critical thermal maxima. This effect was assessed through a transcriptomic analysis of genes involved in processes such as ionic regulation and membrane permeability, thermal stress and hypoxia. The critical thermal maxima of the shrimp ranged from 33.3 to 41.4°C. Reference genes were validated in real time PCR, and the selected reference genes (*L8* and *Ef1α*) were used to normalized the target genes (*Hsp70*, *Hsp90*, *Hif1α* and *Na⁺/K⁺ ATPase*). According to the relative normalized expression values, we found that ablation induce *Hsp70* gene expression in organisms subjected to acute thermal stress, regardless of acclimation temperature. The *Hsp90* gene showed low and stable levels of expression under acclimation temperatures of 20 and 26°C in organisms exposed to acute thermal stress. Nevertheless, in organisms acclimated to 32°C, the expression of *Hsp90* increased significantly, and when ablation effect is coupled, this expression reached higher levels. The *Hif1α* gene showed higher expression in control than experimental organisms. The expression of *Na⁺/K⁺ ATPase* gene increased, although no significant differences on its expression were found. According to the observed expression levels of *Hif1α* and *Na⁺/K⁺ ATPase* we hypothesized a possibly effect of co-regulation between these genes due to their cellular level functions. In general, the ablated organisms showed alterations on expression regulation of the *L. vannamei* genes involved in processes of ionic regulation, hypoxia and thermal stress.

Keywords: Gene expression, Heat Shock Proteins, Hypoxia, Ionic regulation, Thermal stress and Real time PCR.

Dedicatoria

*A mis padres **Lauro Daniel López Plauchú** y **María Natividad Galindo Romero** y mis hermanas **Karla Daniela López** y **Nataly Elizabeth López** porque gracias a su amor, apoyo y comprensión he logrado cada una de las metas que me he propuesto. Porque gracias a ellos, hoy soy una persona de bien, entregada a mi carrera e ideales. Porque todo lo que soy es gracias a ellos. ¡Los amo!*

*A mis abuelos **Rafaela Romero** y **Lorenzo Galindo** por su amor, cariño, apoyo y porque siempre en todo momento me piensan y me llevan en su corazón.*

*A **Ernesto Larios** por ser esa persona especial que llena mi vida de amor, por su paciencia y apoyo en esta etapa que hace tiempo decidimos comenzar. ¡Te amo amorts!*

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de Maestría.

Al centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), y al departamento de Biotecnología Marina por su valioso apoyo en mi formación académica.

A la Dra. Clara E. Galindo Sánchez por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por su apoyo, por su confianza en mi trabajo y por todos los conocimientos que me ha transmitido durante toda la maestría.

A los miembros del comité de tesis, Dr. Fernando Díaz Herrera, Dra. Paula Pérez Brunius, Dra. Denisse Re Araujo y Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov por sus valiosas sugerencias, aportes y apoyo profesional durante la realización de este trabajo de tesis.

Al Dr. Dariel Tovar y su equipo de trabajo por su apoyo y facilidades otorgadas para la realización de una estancia académica en CIBNOR, La Paz.

Al personal del laboratorio de Biotecnología marina (Dra. Edna Sánchez) y del Laboratorio húmedo e invernaderos (Ing. Ernesto Lerma).

A mis compañeros de laboratorio, Diego Ibarra, Leonel Pérez, Cecilia Rangel y al Dr. Ignacio Leyva por su valioso apoyo y confianza.

A mis amigas Rosalinda Mejía y Patricia Paredes, por su cariño, confianza y apoyo en cada uno de los momentos que las he necesitado.

A mis compañeros y amigos de CICESE por compartir tantos momentos agradables.

A mis hermosas María Eugenia Mendieta (Maru) y Samantha Trujillo (Sam) porque a pesar de la distancia no ha habido un solo momento que no cuente con ellas, por su amor y apoyo incondicional.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de gráficas	ix
Lista de tablas	xii
Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Antecedentes	3
2.1 Características biológicas y producción de <i>Litopenaeus vannamei</i>	3
2.2 Procedimiento de ablación	5
2.3 Temperatura y respuestas fisiológicas en invertebrados marinos	8
2.4 Respuesta a la temperatura a nivel molecular de procesos fisiológicos y metabólicos en organismos marinos	10
2.4.1 Proteínas de choque térmico (HSPs)	11
2.4.2 Genes involucrados en la respuesta a hipoxia	14
2.4.3 Genes involucrados en la capacidad osmorregulatoria de organismos marinos acuáticos.....	18
Capítulo 3. Hipótesis	22
Capítulo 4. Objetivos	23
4.1 Objetivo general:	23
4.2 Objetivos particulares:	23
Capítulo 5. Metodología	24
5.1 Organismos experimentales	24
5.2 Diseño experimental	25
5.2.1. Disección y colecta de tejidos.....	27
5.3 Búsqueda bibliográfica e informática	28
5.4 Genes de referencia	28
5.5 Extracción de RNA, tratamiento con DNAsa y RT-PCR	29
5.6 Análisis de expresión génica cuantitativa por PCR en tiempo real	30
5.6.1 Estandarización de la eficiencia de amplificación por qPCR.	31
5.6.2 Validación de los genes de referencia para el análisis en muestras de branquia de organismos con diferentes condiciones y temperaturas de aclimatación.....	32

Tabla de contenido (continuación)

5.6.3 Cuantificación relativa de la expresión de los genes <i>Hsp70</i> , <i>Hsp90</i> , <i>Hif1α</i> y <i>Na⁺/K⁺ ATPasa</i>	33
5.7 Análisis estadísticos	34
5.7.1 Análisis de la temperatura crítica máxima	34
5.7.2 Análisis de la expresión génica.	34
Capítulo 6. Resultados	35
6.1 Organismos experimentales y tejidos obtenidos	35
6.2 Temperatura Crítica Máxima	35
6.3 Búsqueda bibliográfica y bioinformática	37
6.4 Extracción de RNA	39
6.4.1 Purificación del RNA.....	41
6.4.2 Síntesis de cDNA	43
6.5 Estandarización de genes de referencia y blanco en PCR punto final	43
6.6 Estandarización de primers en qPCR.....	45
6.7 Validación de los genes de referencia	46
6.8 Cuantificación de la expresión relativa de los genes <i>Hif1α</i> , <i>Na⁺/K⁺ ATPasa</i> , <i>Hsp70</i> y <i>Hsp90</i> en branquia de camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i>	52
6.8.1 Expresión relativa del Gen <i>Hsp70</i>	52
6.8.1.1 Organismos controles.....	52
6.8.1.2 Organismos experimentales.....	52
6.8.2 Expresión relativa del Gen <i>Hsp90</i>	54
6.8.2.1 Organismos controles.....	54
6.8.2.2. Organismos experimentales.....	54
6.8.3 Expresión relativa del Gen <i>Hif1α</i>	56
6.8.3.1 Organismos controles.....	56
6.8.3.2 Organismos experimentales	56
6.8.4 Expresión relativa del Gen <i>Na⁺/K⁺ ATPasa</i>	58
6.8.4.1. Organismos controles.....	58
6.8.4.2 Organismos experimentales	58
Capítulo 7. Discusión.....	60
7.1 Validación de los genes de referencia para el análisis en muestras de branquia de organismos con diferentes condiciones y temperaturas de aclimatación.....	60
7.2 Expresión relativa de los genes <i>Hsp70</i> y <i>Hsp90</i> en branquia de camarón blanco <i>L. vannamei</i>	64

Tabla de contenido (continuación)

7.3 Expresión relativa de <i>Hif1α</i>	68
7.4 Expresión relativa de <i>Na⁺/K⁺ ATPasa</i>	71
Capítulo 8. Conclusiones	73
Lista de referencias	75
Anexo 1: Protocolos estandarizados	83
1.1 Protocolo de extracción de RNA.....	83
1.2 Protocolo para Purificación de RNA (Tratamiento con DNAsa).....	84
1.3 Protocolo para transcripción reversa (Síntesis de cDNA) con kit ImProm-II™ Reverse Transcription System	85
1.4 Protocolo PCR en tiempo real (qPCR) para realizar curvas de eficiencia.....	87
Anexo 2: Preparación de soluciones	88
2.1 Solución casera para preservación de ácidos nucleicos (Buffer NAP) (1.5 L)	88
2.2 EDTA 0.5M (500 ml).....	88
2.3 Solución stock TAE 50X (1 L).....	88
2.4 Agua DEPC (1L).....	89
2.5 Geles de Agarosa al 1% y 1.5%.....	89

Lista de gráficas

Figura		Página
1	Principales países productores de <i>Litopenaeus vannamei</i> (FAO, 2013).....	4
2	Estanques de 2000 L para mantenimiento y crecimiento de organismos. a) Invernadero CICESE y b) Larvas de camarón blanco.....	24
3	Estanques de 500L de capacidad para la aclimatación a diferentes temperaturas de organismos experimentales.....	25
4	Proceso de ablación de pedúnculo ocular realizado en <i>L. vannamei</i> (Fotos realizadas por la Dra. Denisse Re Araujo).....	26
5	Experimento de TCM _{max} y sobrevivencia realizados en acuarios de 60L.....	27
6	Disección de tejido de branquia en organismos de <i>L. vannamei</i>	28
7	Análisis de varianza de dos vías de la TCM _{max} obtenida de los organismos experimentales. (Las letras indican la condición versus la aclimatación en las cuales no se encontraron diferencias altamente significativas $p > 0.05$). Las líneas con desviaciones denotan los intervalos de confianza (0.95) para cada media.....	37
8	Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de algunas de las muestras de RNA obtenidas a partir del tejido de branquia. El gel se corrió a 80 volts durante 50 minutos.....	41
9	Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para verificar la efectividad del tratamiento con DNAsa y calidad de RNA. El gel se corrió a 80 volts durante 50 min.....	42
10	Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del PCR punto final para verificar tratamiento con DNAsa de las muestras de RNA extraídas.....	42
11	Gradiente de temperatura realizado para los genes de referencia con las condiciones de reacción y programa del termociclador utilizados (Gel de agarosa al 1.5%, 60 minutos a 80 volts).....	44
12	Gradiente de temperatura realizado para los genes <i>HSP70</i> , <i>HSP90</i> y <i>Na⁺/K⁺ ATPasa</i> (Gel de agarosa al 1.5%, 50 minutos a 80 volts).....	44
13	Picos de disociación obtenidos mediante la curva de disociación para cada uno de los genes de referencia evaluados. a) <i>L8</i> , b) <i>β-actina</i> , c) <i>Ef1α</i> y d) <i>gapdh</i>	45
14	Curvas estándar de los genes de referencia <i>Ef1α</i> (a) y <i>L8</i> (b).....	46
15	Estabilidad de la expresión (M) de los genes de referencia evaluados con <i>Genorm</i>	48
16	Determinación del número óptimo de genes de referencia para la normalización de los genes blanco obtenido mediante <i>Genorm</i>	48

Lista de gráficas (continuación)

Figura		Página
17	Cuantificación relativa de la expresión de los genes de referencia mediante <i>Genorm</i>	49
18	Estabilidad de la expresión obtenida con <i>Normfinder</i> . a) Estabilidad evaluada por tejido; b) Estabilidad evaluada por condición y temperatura de aclimatación.....	50
19	Estabilidad de la expresión de los genes de referencia obtenida mediante <i>Bestkeeper</i>	51
20	Análisis de varianza de dos vías de la expresión relativa del gen <i>Hsp70</i> en controles no ablacionados de aclimatación y sometidos a TCMáx. (Las letras indican la condición versus la aclimatación en las cuales no se encontraron diferencias altamente significativas $p>0.05$). Las líneas con desviaciones denotan los intervalos de confianza (0.95) para cada media.....	53
21	Análisis de varianza de dos vías de la expresión relativa del gen <i>Hsp70</i> en organismos sometidos a TCMáx. (Las letras indican la condición versus la aclimatación en las cuales no se encontraron diferencias altamente significativas $p>0.05$). Las líneas con desviaciones denotan los intervalos de confianza (0.95) para cada media y los marcadores (círculo, cuadrado y rombo) con sus respectivos errores estándar muestran las TCMáx correspondientes para cada condición por temperatura de aclimatación.....	53
22	Análisis de varianza de dos vías de la expresión relativa del gen <i>Hsp90</i> en controles no ablacionados de aclimatación y sometidos a TCMáx. (Las letras indican la condición versus la aclimatación en las cuales no se encontraron diferencias altamente significativas $p>0.05$). Las líneas con desviaciones denotan los intervalos de confianza (0.95) para cada media.....	55
23	Análisis de varianza de dos vías de la expresión relativa del gen <i>Hsp90</i> en organismos sometidos a TCMáx. (Las letras indican la condición versus la aclimatación en las cuales no se encontraron diferencias altamente significativas $p>0.05$). Las líneas con desviaciones denotan los intervalos de confianza (0.95) para cada media y los marcadores (círculo, cuadrado y rombo) con sus respectivos errores estándar muestran las TCMáx correspondientes para cada condición por temperatura de aclimatación.....	55
24	Análisis de varianza de dos vías de la expresión relativa del gen <i>Hif1α</i> en controles no ablacionados de aclimatación y sometidos a TCMáx. (Las letras indican la condición versus la aclimatación en las cuales no se encontraron diferencias altamente significativas $p>0.05$). Las líneas con desviaciones denotan los intervalos de confianza (0.95) para cada media.....	57

Lista de gráficas (continuación)

Figura		Página
25	Análisis de varianza de dos vías de la expresión relativa del gen <i>Hif1α</i> en organismos sometidos a TCM \acute{a} x. (Las letras indican la condición versus la aclimatación en las cuales no se encontraron diferencias altamente significativas $p>0.05$). Las líneas con desviaciones denotan los intervalos de confianza (0.95) para cada media y los marcadores (círculo, cuadrado y rombo) con sus respectivos errores estándar muestran las TCM \acute{a} x correspondientes para cada condición por temperatura de aclimatación.....	57
26	Análisis de varianza de dos vías de la expresión relativa del gen <i>Na$^{+}$/K$^{+}$ ATPasa</i> en controles no ablacionados de aclimatación y sometidos a TCM \acute{a} x. (Las letras indican la condición versus la aclimatación en las cuales no se encontraron diferencias altamente significativas $p>0.05$). Las líneas con desviaciones denotan los intervalos de confianza (0.95) para cada media.....	59
27	Análisis de varianza de dos vías de la expresión relativa del gen <i>Na$^{+}$/K$^{+}$ ATPasa</i> en organismos sometidos a TCM \acute{a} x. (Las letras indican la condición versus la aclimatación en las cuales no se encontraron diferencias altamente significativas $p>0.05$). Las líneas con desviaciones denotan los intervalos de confianza (0.95) para cada media y los marcadores (círculo, cuadrado y rombo) con sus respectivos errores estándar muestran las TCM \acute{a} x correspondientes para cada condición por temperatura de aclimatación.....	59

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Función de los genes de referencia evaluados.....	29
2	Organismos totales obtenidos a partir del experimento de TCM _{max} por cada temperatura de aclimatación.....	35
3	Alcance de tolerancia térmica de los organismos sometidos a TCM _{max} bajo las diferentes temperaturas de aclimatación y condición.....	36
4	Prueba <i>a posteriori</i> de Tukey para evaluar las significancias en la TCM _{max} de los organismos experimentales. AU: Ablacionados unilateralmente; AB: Ablacionados bilateralmente; NA: No ablacionados.....	38
5	Función de los genes involucrados en regulación iónica, hipoxia y estrés térmico del camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i>	38
6	Secuencias de los oligonucleótidos-primers de los genes de referencia y blanco. pb: pares de bases; GC: porcentaje de Guanina-Citocina; Tm': temperatura de disociación calculada; T: temperatura de alineamiento; Cq: ciclo de cuantificación mínimo de la curva estándar; Tm: temperatura de disociación; e: eficiencia.....	40
7	Condiciones de la reacción de PCR con primers del gen 18s y programa utilizado en el termociclador para verificar el tratamiento con DNAsa.....	42
8	Condiciones de la reacción de PCR punto final para los genes de referencia.....	44
9	Valores de Cq promedio obtenidos para cada gen de referencia...	47
10	Ranking de los genes de referencia obtenido mediante la herramienta RetFinder de Cotton EST Database North Carolina...	51

Capítulo 1. Introducción

Litopenaeus vannamei o camarón blanco es una especie de crustáceo peneido nativo de la costa oriental del Océano Pacífico que se distribuye desde Sonora, México hasta Tumbes, Perú. Habita suelos lodosos en aguas de ambientes marinos tropicales con una temperatura normalmente superior a los 20°C (FAO, 2013; Ramos-Cruz, 2011). Esta especie presenta una gama de características ecológicas que la colocan como idónea para su cultivo en ambientes controlados.

Puede reproducirse rápidamente en cautiverio, posee un amplio rango de tolerancia a factores ambientales como la temperatura y la salinidad, tiene una buena asimilación en dietas que contienen bajos porcentajes de proteína y crecen rápido en comparación con otras especies de camarones peneidos (Kumlu *et al.*, 2011). Sus rangos de tolerancia tanto de temperatura como de salinidad, van de los 15°C a los 33°C y de 0.5 a 40 psu, respectivamente (Briggs *et al.*, 2004; FAO, 2013; Ramos-Cruz, 2011; Re *et al.*, 2012).

Estas características han posicionado al camarón blanco como una de las especies más cultivadas no sólo en América sino también en Asia ya que posee un alto valor comercial y demanda, además de excelentes características de reproducción, lo cual ha permitido su producción a gran escala en varios países del sudeste asiático, primordialmente en China, Indonesia y Tailandia. A nivel global la producción de las granjas de camarón se incrementa a una tasa promedio del 12% donde la mayoría del crecimiento se debe a *L. vannamei*.

Debido a su importancia económica se han implementado procedimientos para poder acelerar las tasas de reproducción de estos organismos, debido a que muchas especies de crustáceos de importancia comercial son incapaces de madurar espontáneamente en condiciones de cautiverio y a tasas relativamente rápidas. El procedimiento utilizado en los criaderos comerciales de camarón es la ablación del pedúnculo ocular (Eyestalk Ablation o EA), la cual estimula la maduración gonadal en camarones (Lago-Lestón *et al.*, 2007). Este procedimiento implica la extirpación del órgano X-glándula del seno, la cual es la principal glándula endocrina de crustáceos que produce, entre otras, la hormona inhibidora de gónada y vitelogénesis (GIH, VIH, respectivamente). Mediante la

eliminación de una parte del suministro de GIH, se puede alcanzar una maduración gonádica más rápida (Palacios *et al.*, 1999).

Sin embargo, a pesar de las amplias ventajas de este procedimiento, también existen desventajas ya que, se producen larvas de baja calidad después de desoves sucesivos y los reproductores tienen que ser descartados debido a la rápida pérdida de condición, pone en peligro el crecimiento, reduce el ciclo de la muda, aumenta las demandas energéticas y eventualmente tiene como resultado la pérdida de la calidad de los ovocitos y una alta mortalidad (Uawisetwathana *et al.*, 2011). También causa el desarrollo desigual del ovario, desarrollo asincrónico de ovocitos, gametogénesis concurrente y citolisis, y un patrón de liberación alterado de ovocitos maduros (Palacios *et al.*, 1999).

Por otra parte, los crustáceos han desarrollado un complejo sistema neuroendocrino que involucra elementos regulatorios capaces de actuar a corto, mediano y largo plazo, permitiéndole responder a factores externos mediante el ajuste de sus funciones vitales. Dentro de las condiciones externas reguladas por estos factores se encuentran la temperatura, salinidad, fotoperiodicidad, nutrición y estrés (Lago-Lestón *et al.*, 2007). Como se puede observar, la mayoría de los estudios están enfocados al efecto de la EA en la reproducción, sin enfatizar las rutas que pueden ser potencialmente afectadas por este procedimiento.

En la actualidad, desafortunadamente son pocas las investigaciones enfocadas al estudio del efecto sobre otras rutas metabólicas que regulan la respuesta a condiciones externas como la temperatura y estrés, que son afectadas por el procedimiento de la ablación, debido a la eliminación de una parte del complejo del sistema neuroendocrino. Por lo tanto, debido al importante papel que juega el pedúnculo ocular en *Litopenaeus vannamei* no sólo en la reproducción, sino también en la respuesta a nivel molecular del organismo ante estas condiciones externas, esta investigación pretende evaluar la respuesta de *Litopenaeus vannamei* a la exposición a la temperatura crítica máxima en organismos ablacionados unilateral y bilateralmente, y aclimatados a diferentes temperaturas mediante la expresión de genes en diferentes vías metabólicas y de algunas proteínas involucradas en la protección y mantenimiento celular.

Capítulo 2. Antecedentes

2.1 Características biológicas y producción de *Litopenaeus vannamei*

Litopenaeus vannamei conocido comúnmente como camarón blanco es una especie de crustáceo decápodo de la familia Penaeidae, nativo del Pacífico oriental cuya distribución geográfica abarca desde Sonora, México hasta Tumbes, Perú; en aguas cuya temperatura es normalmente superior a los 20°C todo el año (FAO, 2013; Ramos-Cruz, 2011). Se localiza en hábitats marinos tropicales con fondos lodosos. Los adultos viven y se reproducen en mar abierto, mientras que la postlarva migra a las costas a pasar la etapa juvenil, la etapa adolescente y preadulta en estuarios, lagunas costeras y manglares (FAO, 2013).

La etapa de maduración en los machos se da a partir de los 20 g y 28 g en hembras a una edad entre 6 y 7 meses. Al alcanzar un peso entre 30 y 45g las hembras desovan entre 100,000 y 250,000 ovocitos de 0.22 mm de diámetro, aproximadamente. La incubación ocurre 16 horas después del desove y la fertilización. En la primera etapa el nauplio (larva) nada intermitentemente, es fototáctico positivo y no requiere alimentación ya que se nutre de su reserva embrionaria. En las siguientes etapas larvarias (protozoa, mysis y postlarva temprana) continúa siendo planctónico, por algún tiempo se alimenta del zooplankton y fitoplancton y es transportado a la costa por las corrientes mareales. Las postlarvas (PL) cambian sus hábitos planctónicos unos 5 días después de su metamorfosis a PL, se trasladan a la costa y comienzan a alimentarse de detritos bénticos, gusanos, bivalvos y crustáceos. Estos organismos suelen alcanzar una talla máxima de 23 cm y las hembras crecen más rápido y adquieren una mayor talla que los machos (FAO, 2013).

Estas especies pueden reproducirse rápidamente en cautiverio y en crecerse a altas densidades (por encima de 400 m² en sistemas de recirculación), tienen un amplio rango de tolerancia a parámetros ambientales como la temperatura y salinidad, asimilan mejor dietas que contienen bajos porcentajes de proteína, poseen una alta resistencia a enfermedades, cuentan con tasas altas de sobrevivencia larval (50-60%) y tienen una tasa de crecimiento relativamente rápida (más de 3g por semana) en comparación con

otras especies de camarones peneidos (Re *et al.*, 2012a; Kumlu *et al.*, 2011). Es una especie eurihalina capaz de tolerar salinidades en el rango de 1 a 40 psu, característica ecológica que lo hace un candidato idóneo para su cultivo en ambientes controlados (FAO, 2013; Ramos-Cruz, 2011).

El camarón blanco es una de las especies comúnmente más cultivadas no sólo en América sino también en Asia debido a que posee un alto valor comercial y excelentes características de reproducción. Gracias a esto se ha convertido en una de las principales especies de la acuicultura de varios países del sudeste asiático, primordialmente en China, Indonesia y Tailandia durante los últimos años. (Qian *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2008). En la figura 1 se muestran los principales países productores de camarón blanco a nivel mundial (FAO, 2013).



Figura 1. Principales países productores de *Litopenaeus vannamei* (FAO, 2013)

La producción global de las granjas de camarón se incrementa a una tasa promedio del 12%, alcanzando un total de 2.4 millones de toneladas en 2008 con un valor económico cerca de los 9.7 millones de dólares. La mayor parte de este crecimiento se debe a la

producción de camarón blanco *L. vannamei* (FAO, 2013). En particular en el noroeste de México, en el estado de Sonora, la producción del cultivo de camarón aumentó un 900% durante 2009 (Soñanez-Organis *et al.*, 2009).

2.2 Procedimiento de ablación

A pesar de la importancia económica de *L. vannamei* a nivel mundial, un problema importante en la acuicultura es la obtención de crías debido a que muchas especies de crustáceos de importancia comercial son incapaces de madurar espontáneamente en condiciones artificiales. El procedimiento comúnmente utilizado en los criaderos comerciales de camarón es la ablación unilateral del pedúnculo ocular (Eyestalk Ablation o EA) para estimular la maduración gonadal en camarones (Lago-Lestón *et al.*, 2007).

La ablación de pedúnculo ocular ha sido utilizada desde 1970 para mejorar la producción en acuicultura de larvas de *Penaeus* spp. (Sainz-Hernández *et al.*, 2008). La EA implica la extirpación de una glándula del seno, la cual es la principal glándula endocrina de crustáceos que produce, entre otras, la hormona inhibidora de gónada y vitelogénesis (GIH, VIH, respectivamente). Mediante la eliminación de una parte del suministro de GIH, se puede alcanzar una maduración gonádica más rápida (Palacios *et al.*, 1999).

Además de mejorar el rendimiento reproductivo, hay evidencia de otras consecuencias metabólicas que aún no están completamente elucidadas. El órgano X-complejo glándula del seno (OX-GS), localizado en los pedúnculos oculares, es la principal glándula neuroendocrina en crustáceos. En esta glándula, se sintetizan, almacenan y secretan hormonas a la hemolinfa para regular varios procesos metabólicos. Los procesos mejor estudiados son la vitelogénesis, la ingesta de alimentos, digestión y transporte de nutrientes, la muda, el metabolismo de lípidos, la regulación de la glucosa y proteínas en la hemolinfa, el equilibrio hidromineral, la regeneración y la producción de pigmentos (Sainz-Hernández *et al.*, 2008).

Sin embargo, estas hormonas de la glándula del seno están también involucradas en el metabolismo de lípidos por la inducción del desarrollo gonádico, un proceso involucrado

en la acumulación de la vitelogenina y lípidos en gónadas. Los efectos generales de la EA en la reproducción, incluyendo la movilización de lípidos desde el hepatopáncreas hacia la gónada, se atribuyen principalmente a la reducción concomitante de la hormona inhibidora en la gónada producida por la glándula del seno. Sin embargo, se sugiere también que la hormona hiperglucémica (CHH) estimula la movilización de lípidos desde el hepatopáncreas con un incremento concomitante en varias clases de lípidos en la hemolinfa (Sainz-Hernández *et al.*, 2008).

Este procedimiento conduce a picos predecibles de maduración y desove que facilitan el establecimiento de programas de producción, en contraste con desoves dispersos de hembras no sometidas a la EA. Varios estudios han demostrado la ventaja de este procedimiento debido al incremento en la producción de una mayor cantidad de desoves, ovocitos y nauplios totales por hembra (Kumlu *et al.*, 2011; Palacios *et al.*, 1999). Las hembras ablacionadas adquieren una maduración más rápida, pero no altas tasas de fertilización y eclosión (Kumlu *et al.*, 2011). Además se pueden aumentar las demandas bioenergéticas del desovador, y como consecuencia se puede ocasionar un efecto sobre la calidad o la supervivencia del desovador. Se ha reportado que la calidad del desovador y la subsecuente sobrevivencia de las larvas se ve afectada negativamente cuando éstos han sido ablacionados (Palacios *et al.*, 1999).

La calidad del desovador puede verse afectada en dos puntos: inmediatamente después de la ablación, tiempo durante el cual las hembras pueden producir desoves abortivos o de baja viabilidad; y con el paso del tiempo, las hembras ablacionadas pueden producir desoves que reducirán su calidad paulatinamente o en desoves sucesivos. También se ha reportado que existe un incremento en la mortalidad inmediatamente después del proceso de ablación, la cual parece depender de la etapa de muda del camarón, el procedimiento utilizado para la ablación y el estrés (manejo, infección, pérdida de hemolinfa) que involucra el manejo. Se ha reportado que la reducción de la viabilidad del desove y los desoves abortivos son el resultado del estrés causado al organismo en lugar de la reducción de los niveles hormonales (Palacios *et al.*, 1999).

Con la subsecuente reducción de los niveles de GIH y la hormona inhibidora de la muda (MIH) como resultado de la EA, se fuerza a la hembra a reproducirse y mudar con mayor frecuencia, y por tanto requiere una gran cantidad de energía. También la duración de los ciclos de muda se reducen en ambos sexos del camarón blanco (Sainz-Hernández *et al.*, 2008). Así mismo, se ha reportado que este proceso incrementa la ingestión de comida y produce una utilización fisiológica de la energía más eficiente. Sin embargo, como consecuencia del incremento en el gasto energético impuesto por la EA, los camarones en proceso de reproducción pierden peso (Palacios *et al.*, 1999).

En la actualidad la inducción de la maduración a través del proceso de ablación de los pedúnculos oculares es una técnica extensamente utilizada por casi todos los criaderos comerciales y centros de investigación en todo el mundo (Kumlu *et al.*, 2011).

La mortalidad está directamente relacionada con el grado de ablación, debido al fuerte estrés fisiológico resultado de la eliminación parcial o total de la glándula endocrina principal, especialmente si la EA se realiza dos días después de la muda. La ablación no sólo remueve este órgano sino que también produce trauma severo, destruye la mayor parte del sistema nervioso y deja ciego al animal (Sainz-Hernández *et al.*, 2008). El aumento en el estrés causado por este procedimiento en el organismo tiene como resultado un incremento en la tasa de respiración y la reducción en el nivel de actividad metabólica comparado con organismos no ablacionados (Palacios *et al.*, 1999).

Por otra parte, los crustáceos han desarrollado este complejo sistema neuroendocrino que involucra elementos regulatorios capaces de actuar a corto, mediano y largo plazo, permitiéndole responder a factores externos mediante el ajuste de sus funciones vitales a sus necesidades actuales (Lago-Lestón *et al.*, 2007). Dentro de las condiciones externas reguladas por estos factores se encuentran la temperatura, salinidad, fotoperiodicidad, nutrición y estrés (Lago-Lestón *et al.*, 2007). Como se puede observar, la mayoría de los estudios están enfocados al efecto de la EA en la reproducción sin enfatizar en las rutas que se ven afectadas por este procedimiento.

Existen técnicas alternativas para controlar la reproducción del camarón, sin embargo han recibido poca atención, y este tipo de estudios se han centrado principalmente en la inyección de diferentes hormonas o la manipulación de los regímenes de

temperatura/fotoperiodo. Por lo tanto, la maduración y desove predecible en el camarón blanco en cautiverio sin llevar a cabo la técnica de ablación es un objetivo a largo plazo de la industria camaronera (Uawisetwathana *et al.*, 2011).

2.3 Temperatura y respuestas fisiológicas en invertebrados marinos

La temperatura es uno de los principales factores que afectan aspectos importantes de un organismo como el crecimiento, el metabolismo, la tasa de fecundidad, la sobrevivencia y el comportamiento. En sistemas acuáticos naturales, la temperatura del agua es modificada a su vez, por variaciones climáticas temporales a pequeña y gran escala, además de factores antropogénicos, que causan cambios en la distribución o variación de la temperatura (Dallas, 2008; Zhou *et al.*, 2010) .

Todos los organismos tienen un rango de temperatura dentro del cual se encuentra su crecimiento y tasa de reproducción óptima, definido como el régimen termal óptimo. Cualquier temperatura fuera de este régimen puede afectar el metabolismo, crecimiento, comportamiento, hábitos alimenticios, reproducción e historia de vida, distribución geográfica y estructura de la comunidad, movimiento y migraciones, así como la tolerancia a parásitos, enfermedades y contaminación, entre otros, de organismos acuáticos (Dallas, 2008).

El camarón blanco *L. vannamei* es un organismo altamente estudiado el cual tolera un amplio rango de temperaturas, que van de los 15°C a los 33°C, sin embargo su tasa de crecimiento se ve reducida ya que su crecimiento óptimo se da a 30°C en camarones de talla pequeña/larvas (1g) y 27°C en camarones de talla grande/juveniles (12-18g) (Briggs *et al.*, 2004). La temperatura crítica máxima (TCM_{máx}) es un indicador de la tolerancia térmica del camarón blanco que permite identificar la temperatura a la cual se muestran los primeros síntomas de estrés térmico y eventualmente la respuesta fisiológica del organismo. Este organismo presenta una TCM_{máx} en un rango de 35.8-41.5°C (Re *et al.*, 2012). Paladino *et al.*, (1980) mencionan que en acuicultura, es sumamente importante conocer los límites térmicos (TCM_{máx} y TCM_{mín}) debido a que ayudan a indicar la resistencia térmica de los organismos marinos. Ambos métodos son no destructivos e identifican las temperaturas a las cuales ocurren estos primeros

síntomas de estrés (Re *et al.*, 2012). El límite térmico se define como la media aritmética a la cual la actividad locomotora de cada organismo se desorganiza, perdiendo la habilidad de escapar de las condiciones que pueden conducirlo a la muerte, los cuales pueden deberse al bloqueo neuromuscular y la falla presináptica (Kumlu *et al.*, 2010; Re *et al.*, 2012). La TCM_{máx} una de las metodologías de la temperatura crítica que involucra el cambio de la temperatura a una tasa constante hasta un punto final predefinido, es decir, se realiza un aumento gradual de la temperatura a razón de 1°C por minuto hasta llegar a la temperatura crítica máxima en la cual se registran los primeros síntomas fisiológicos de estrés (Re *et al.*, 2012).

El comportamiento observado en los organismos en respuesta al incremento de la temperatura se clasifica en tres categorías: 1) 'Movimiento activo': cuando el camarón se mueve (camina o nada) a lo largo de una distancia que excede su propio tamaño en menos de 30 segundos; 2) 'Pérdida del equilibrio': cuando el camarón se inclina sobre su cefalotórax durante más de 2 segundos; y 3) 'Espasmos': vibración de los pleópodos o contracción repentina del abdomen sin ningún movimiento coordinado (Ravaux *et al.*, 2012).

Re *et al.*, (2012) encontraron que existen diferencias altamente significativas en la temperatura preferida (PT) de camarones no ablacionados (PT de 26.1°C) y ablacionados unilateral (PT de 23.25°C) y bilateralmente (PT de 23.01°C), evitando temperaturas en un rango de 38.5 y 13.1°C. Por lo que concluyen, que existe una diferencia significativa entre la condición normal de estos organismos versus el procedimiento de ablación, mostrando que en los organismos que fueron ablacionados la PT fue modificada disminuyendo la preferencia térmica.

A nivel fisiológico, la temperatura de acuerdo con Vernberg y Silverthorn (1979) afecta las características osmóticas de los fluidos, particularmente la permeabilidad de la membrana y causa variaciones en el flujo iónico e hídrico.

2.4 Respuesta a la temperatura a nivel molecular de procesos fisiológicos y metabólicos en organismos marinos

Un determinante principal en los organismos para superar los cambios en su ambiente, es el complemento de los elementos regulatorios de los genes (incluyendo aquellos que codifican para proteínas) necesarios para reparar el daño celular inducido por estrés (alteración de la homeostasis del organismo que afecta el crecimiento, la reproducción y la susceptibilidad a enfermedades), y así generar la plasticidad fenotípica adaptativa (Aparicio-Simón *et al.*, 2010; Somero, 2010). A corto plazo los organismos deben ajustar su expresión genética para adquirir esta plasticidad en respuesta a factores físicos y químicos. No obstante, estas condiciones estresantes desencadenan consecuencias a nivel celular, fisiológico e individual. Puede conducir a fuertes cambios en los procesos metabólicos, perturbar funciones vitales y por tanto la sobrevivencia, el crecimiento, la reproducción, interacciones biológicas y la estructura de las comunidades y ecosistemas (Gusmão, 2011).

A nivel celular la temperatura afecta estructuras celulares como el complejo de Golgi, mitocondria, citoesqueleto, entre otros, causando una reducción en el flujo sanguíneo hacia los tejidos periféricos, depresión metabólica y desbalance iónico (Gusmão, 2011).

Diferentes estudios de los cambios inducidos por estrés en la expresión de genes y proteínas, han logrado elucidar la respuesta principal al estrés celular, el cual está presente en todos los grupos taxonómicos en respuesta a un amplio rango de factores de estrés abióticos, incluyendo cambios en temperatura, concentración de oxígeno, especies reactivas al oxígeno (ROS, por su siglas en inglés), salinidad y pH (Kültz, 2005).

Debido a que los organismos se encuentran sometidos a una infinidad de factores de estrés ambientales, entre ellos la temperatura, han desarrollado un sistema de defensa basado en proteínas que participan en diferentes rutas metabólicas y que permiten hacer frente a estos cambios (Guo *et al.*, 2010a)

2.4.1 Proteínas de choque térmico (HSPs)

Las proteínas de choque térmico son proteínas chaperonas ubicuas que hacen frente a la desnaturalización inducida por estrés de otras proteínas celulares y han sido conservadas evolutivamente en diversos organismos (Li *et al.*, 2009a; Luan *et al.*, 2010). La primer descripción de este grupo de proteínas celulares se obtuvo en 1962 por Ritossa al ser inducidas por choque térmico en *Drosophila*, lo que a su vez desencadenó una intensiva investigación sobre su función en la tolerancia a diferentes tipos de estrés en una amplia variedad de organismos (Gusmão, 2011; Lo *et al.*, 2004).

Como biomarcadores potenciales, las HSPs pueden ser inducidas generalmente por varios factores ambientales bióticos y abióticos tales como la hipertermia, hipoxia, metales pesados, contaminantes orgánicos, anoxia, osmolaridad e infecciones por *Vibrio* para proteger a los organismos de daños causados por la sobrecarga de proteínas mal plegadas en las células (Li *et al.*, 2009a; Luan *et al.*, 2010; Zhenyu *et al.*, 2004). Se ha reportado que las HSPs son sintetizadas rápidamente dentro de las células estresadas después de la exposición a un factor ambiental (Li *et al.*, 2009a).

Las proteínas de choque térmico son uno de los primeros sistemas de defensa intracelular y actúan como indicadores clave en la respuesta ante estrés térmico del camarón blanco *L. vannamei* y comprende a un grupo de proteínas altamente conservadas relacionadas con la resistencia del cuerpo a condiciones ambientales adversas (Guo *et al.*, 2010a) . Bajo condiciones de estrés las HSPs sirven como reguladores de la función normal de las células, ayudan a prevenir la desnaturalización de otras proteínas, asisten el replegamiento de proteínas desnaturalizadas, minimizan la agregación de proteínas no nativas y la ocurrencia de agregaciones citotóxicas, marcan proteínas desnaturalizadas o agregadas para su degradación y remoción fuera de la célula (Feder y Hofmann, 1999; Madeira *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2010b), importantes en procesos de reparación de DNA, translocación de proteínas entre organelos celulares y respuesta inmune (Gusmão, 2011). Su función está basada en reacciones inducidas por estrés para mantener la homeostasis celular, por lo cual la expresión de las HSPs siempre es considerada como un indicador de estrés en un

organismo (Guo *et al.*, 2010b; Guo *et al.*, 2010a; Qian *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2010a; Gusmão, 2011).

Los beneficios de la expresión de estas proteínas se asocian al incremento substancial de la habilidad para sobrevivir a un estrés térmico. Adicionalmente, bajos niveles de expresión ante condiciones de estrés leve o moderado pueden tener efectos benéficos, tales como el incremento en la longevidad y la resistencia a estrés térmico. Esto sugiere que las HSPs son importantes para la salud de los organismos en todas las etapas de vida, no sólo bajo condiciones de estrés severo, sino bajo condiciones ambientales de estrés moderado (Madeira *et al.*, 2012).

La síntesis y la función como chaperonas de las HSPs requiere de un consumo de energía, lo cual se traduce en una “inversión-ingreso” entre la energía de la tolerancia térmica y la asignada para el crecimiento y la reproducción. El costo de la expresión de las HSPs se debe principalmente a la gran cantidad de energía necesaria para su producción y mantenimiento, así como los efectos tóxicos asociados con un alto nivel de HSPs (Madeira *et al.*, 2012). Para ello la inducción de la expresión de las proteínas de choque térmico requieren de una cierta temperatura de inducción, aumentando con ello la expresión de las HSPs para adaptarse a los cambios producidos por la temperatura (Guo *et al.*, 2010b). Comparada con la temperatura normal, la temperatura subletal induce una alta expresión de las *Hsp70* en *L. vannamei* indicando que existe probablemente una correlación entre el incremento de la expresión de *Hsp70* y el aumento de la capacidad de autoprotección (Guo *et al.*, 2010a).

Las HSPs en eucariotas se encuentran divididas en seis familias principales: HSPs pequeñas o de bajo peso molecular, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100 y HSP110, de acuerdo con su peso molecular en kilodaltons (KDa) (Lo *et al.*, 2004; Qian *et al.*, 2012). En eucariotas la familia de las HSP70 se encuentran altamente conservadas y consisten en dos formas principales: una inducida por estrés (HSP70) y una expresada constitutivamente (Heat shock cognate 70, HSC70), las cuales difieren tanto en sus estructuras como en sus niveles de expresión bajo condiciones ambientales variables (Qian *et al.*, 2012; Luan *et al.*, 2010). Dentro de esta familia también se localiza la proteína 78 regulada por glucosa (Grp78), la HSP mitocondrial (HSP75) y las proteínas

de unión a cadenas pesadas (Bip) que se localizan en el retículo endoplasmático (Lo *et al.*, 2004; Luan *et al.*, 2010). Los miembros de esta familia juegan un rol esencial en el metabolismo de proteínas en organismos estresados y no estresados (Lo *et al.*, 2004). Una de las funciones principales de las HSP70 es rescatar proteínas intracelulares que son degeneradas o agregadas bajo condiciones de estrés (Guo *et al.*, 2010b).

La estructura funcionalmente conservada de las HSP70 contiene tres dominios principales: El dominio adenosina trifosfatasa (ATPasa) N-terminal (44KDa) el cual se une e hidroliza ATP; y el dominio de péptido-unión el cual interactúa con los polipéptidos no plegados (18 KDa); y el dominio C-terminal altamente conservado que lleva la secuencia terminal EEVD presente en todas las HSP70 eucariotas (Lo *et al.*, 2004). Los miembros de esta familia interactúan con una amplia variedad de proteínas llevando a cabo funciones como chaperonas específicas. Algunas de estas HSP70 son débilmente expresadas en condiciones normales y son altamente inducidas en condiciones de estrés. Debido a sus características de inducción los genes que codifican para las proteínas HSP70 carecen de intrones (Lo *et al.*, 2004). Las HSP70 pueden ser inducidas por otros factores tales como la hipoxia, acidosis, estrés oxidativo, especies reactivas de nitrógeno, agotamiento de energía celular, infecciones virales o bacterianas, endotoxinas y citotoxinas, metabolismo anaeróbico, metales pesados, prostaglandinas, radiación gamma y UV, altas densidades poblacionales y malnutrición (Gusmão, 2011).

En el caso de las HSC70, su función radica en mantener el metabolismo de proteínas bajo condiciones normales y se encuentran involucradas en procesos fisiológicos celulares que incluyen el plegamiento de nuevas proteínas sintetizadas (Guo *et al.*, 2010b), la translocación de membrana, la formación y desensamblaje de complejos proteicos y la degradación de proteínas mal plegadas (Lo *et al.*, 2004).

Comparado con el progreso en el estudio de las HSP70, se han encontrado pocos reportes sobre las HSP90 en organismos acuáticos. La HSP90 citoplasmática, asociada con sus co-chaperonas contiene un motivo repetido tetratricopéptido conservado, se encuentra involucrada en las vías de regulación celular activando cientos de proteínas incluyendo cinasas, factores de transcripción y receptores esteroides (Li *et al.*, 2009a).

Esta proteína está constituida por tres dominios conservados: el dominio N-terminal con un sitio de unión a adenosina trifosfato (ATP), un dominio central que interactúa con algunas proteínas como P53 y un dominio C-terminal responsable de la dimerización (Li *et al.*, 2009a). Las HSP90 generalmente responde al estrés térmico reduciendo la agregación de proteínas desnaturalizadas o de proteínas agregadas marcadas para degradación (Li *et al.*, 2009a).

Qian *et al.*, (2012) demostraron que la expresión de *Hsp70* es la primer respuesta del organismo ante un estrés térmico, debido a la alta sensibilidad de este gen. La *Hsp60* también tiene una alta sensibilidad ante estrés térmico, sin embargo su expresión es relativamente más baja que la de la *Hsp70*, mientras que las *Hsc70* y *Hsp90* se mantienen más estables ante un estrés causado por la elevación de la temperatura. Por tal motivo, se considera a *Hsp70* como un gen candidato para ser utilizado como biomarcador para evaluar el estrés térmico en la cría de camarón blanco *L. vannamei* debido al rol que desempeña en la protección celular ante un estrés térmico y su alta sensibilidad (Qian *et al.*, 2012).

2.4.2 Genes involucrados en la respuesta a hipoxia

Durante el cultivo de camarón y en condiciones ambientales naturales ocurren algunos episodios de baja concentración de oxígeno disuelto (OD) en el agua o hipoxia (Soñanez-Organis *et al.*, 2009). Algunos camarones peneidos, en contraste con otros crustáceos, pueden tolerar bajas concentraciones de OD, pero su crecimiento puede verse afectado. La conformación y regulación de oxígeno son respuestas metabólicas y fisiológicas adoptadas por los crustáceos bajo condiciones de hipoxia (Soñanez-Organis *et al.*, 2009).

Los conformadores de oxígeno reducen la demanda metabólica para el consumo de O_2 en respuesta a niveles ambientales de O_2 , mientras que los reguladores de oxígeno mantienen el consumo de oxígeno independientemente de los niveles ambientales de O_2 hasta un punto donde el consumo de O_2 es limitante (punto crítico, P_{CRIT}) (Soñanez-Organis *et al.*, 2009). Por debajo de P_{CRIT} , procesos anaeróbicos como la glucólisis anaeróbica llega a ser importante para satisfacer los requerimientos de energía (Soñanez-Organis *et al.*, 2009). P_{CRIT} para *L. vannamei*, es de 5 mg/L OD. *L. vannamei*

cambia a glucólisis anaerobia a largo plazo (3 a 5 días) y corto plazo (6, 12 y 24 hrs) de hipoxia moderada (2-2.6 mg/L OD) y severa (1.0 mg/L OD), respectivamente (Soñanez-Organis *et al.*, 2009; Zenteno-Savín *et al.*, 2006).

Los animales tolerantes a hipoxia emplean diversas estrategias de sobrevivencia, basados primordialmente en la conservación de la energía más que en la compensación de la misma. La habilidad para entrar a un estado de depresión metabólica reversible, está caracterizado por un drástico decremento entre el suministro y consumo de ATP. Esto previene caídas letales en los niveles de ATP celulares y representa una característica de protección y unificación en organismos tolerantes a hipoxia (Gorr *et al.*, 2006; Hardy *et al.*, 2012).

El grado de depresión metabólica (hipometabolismo) se encuentra inversamente relacionado con el periodo de tolerancia a hipoxia. Desde que el 80% del consumo de O₂ mitocondrial es acoplado a la síntesis de ATP, monitoreada como una drástica reducción de la tasa de consumo de oxígeno que ocurre inmediatamente después de que el organismo es sometido a hipoxia (Gorr *et al.*, 2006).

A nivel molecular, el hipometabolismo involucra la supresión coordinada de cada función que utilice ATP principalmente en la célula (por ejemplo: la síntesis de proteínas (30%); degradación de proteínas (20%); ATPasas con motivos iónicos, primordialmente Na⁺/K⁺ ATPasa (25%)), para que coincida con la disminución concomitante en la producción de ATP (Gorr *et al.*, 2006). Durante el estado hipometabólico, el flujo glucolítico, sólo necesita ser elevado y proveer tanto ATP como se requiera para los gastos residuales de energía (Gorr *et al.*, 2006).

El hipometabolismo busca regular las principales vías metabólicas y fisiológicas en función del consumo energético que estas implican como son:

- ❖ Disminución de actividades enzimáticas e inhibición de la síntesis de proteínas: se ha observado que en numerosos moluscos marinos bajo condiciones de hipoxia o anoxia, la actividad de diferentes enzimas y proteínas funcionales se restringe, a través de modificaciones covalentes de fosforilación y desfosforilación. Greenway y Storey (2009) observaron una disminución en

la actividad de diferentes enzimas del metabolismo energético (hexocinasa, PEPCK, Arginin cinasa, fructosa 1,6 bi-fosfato y piruvato cinasa, principalmente). Por otra parte, durante la hipoxia o anoxia se pueden inhibir los procesos de síntesis de proteínas, los cuales bajo condiciones normales son de los procesos que consumen la mayor cantidad de energía y esta inhibición puede darse a nivel de transcripción o traducción (David, 2007).

- ❖ Disminución de la permeabilidad de la membrana: las células tolerantes a hipoxia presentan una permeabilidad baja (debido a la baja densidad o actividad de los canales iónicos membranales) y cuando el oxígeno se agota, la permeabilidad de la membrana hacia los iones se suprime para mantener el potencial electroquímico de la célula estable como en el caso de la normoxia, reduciendo con ello el consumo de energía por la Na^+/K^+ ATPasa (David, 2007).
- ❖ Utilización de reservas de energía (Glucógeno, Aspartato) (David, 2007)
- ❖ Disminución de la síntesis de proteínas antioxidantes (David, 2007)
- ❖ Activación de la transcripción de genes involucrados en la respuesta a hipoxia (Cai et al., 2014; David, 2007)

Existen una familia de factores de transcripción altamente conservados denominadas factores inducibles de hipoxia (HIFs), que actúan como reguladores principales de la homeostasis oxigénica y la respuesta adaptativa a hipoxia (Cai *et al.*, 2014). Estos HIF tienen como objetivo la regulación de diversos genes involucrados en la respuesta a hipoxia como son:

- ❖ Enzimas glucolíticas.- GLUT1 (Transportador) y lactato deshidrogenasa A, las cuales promueven la adaptación celular a la disponibilidad reducida de oxígeno a través del consumo de glucosa y la glucólisis (Bruick, 2003; Soñanez-Organis *et al.*, 2009).
- ❖ Genes para incrementar el transporte de oxígeno a tejidos hipóxicos promoviendo la maduración de glóbulos rojos (Eritropoyetina, transferrina) o

angiogénesis /control vasomotor (incluyendo VEGF-factor de crecimiento endotelial vascular, endotelina-1) (Bruick, 2003; Soñanez-Organis *et al.*, 2009).

- ❖ Genes que promueven la proliferación celular y sobrevivencia (IGF-factor de crecimiento insulínico y proteínas de unión-IGF). La falta de adaptación a bajas condiciones de oxígeno eventualmente conducirá a la muerte celular vía apoptosis (Bruick, 2003).

HIF es un factor de transcripción compuesto de dos subunidades α y β , las cuales son constitutivamente transcritas y traducidas independientemente de la tensión de oxígeno, pero sólo α es regulada a nivel post-traducciona (Bruick, 2003; Soñanez-Organis *et al.*, 2009). El factor inducible de hipoxia 1α (*Hif1\alpha*) es un factor de transcripción que actúa como regulador principal de la expresión de algunos genes en respuesta a hipoxia y promueve la apoptosis celular bajo condiciones de hipoxia crónica (Bruick, 2003; Cai *et al.*, 2014; Kawabe y Yokoyama, 2012). *HIF-1\alpha* contiene dos regiones que modulan su actividad como una función de la disponibilidad de oxígeno, un dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD) y un dominio de transactivación en el C-terminal (C-TAD) (Soñanez-Organis *et al.*, 2009). Bajo condiciones normóxicas, dos residuos de prolina dentro del ODD de la subunidad HIF-1 α son modificados por miembros de la familia de las HIF prolin hidroxilasas (EGLN/HPH/PHD), permitiendo el reconocimiento de HIF por un complejo proteico de ubiquitina ligasa que contiene vPHL y conduce a la degradación de HIF-1 α mediante el proteosoma. Mientras tanto, la asparaginil hidroxilasa FIH-1 modifica el CTAD de HIF-1 α , bloqueando su interacción con coactivadores transcripcionales como p300. Cuando los niveles de oxígeno se reducen (Hipoxia), ambas hidroxilaciones (asparaginil y prolil) se bloquean. HIF-1 α es translocada al núcleo donde se acumula y heterodimeriza con la subunidad HIF-1 β (ARNT-Receptor nuclear translocador aril hidrocarburo) y se unen a los elementos de respuesta a hipoxia (HRE) encontrados en las regiones promotoras de genes blanco específicos, promoviendo así la transcripción de los mismos (Bruick, 2003; Hardy *et al.*, 2012; Kawabe y Yokoyama, 2012).

Las adaptaciones moleculares y fisiológicas son muy importantes para que algunos crustáceos respondan a condiciones frecuentes de hipoxia y anoxia en sus ambientes

naturales y de cultivo (Soñanez-Organis *et al.*, 2009). Sin embargo, se sabe muy poco acerca de la estructura y expresión de las moléculas que participan en estas respuestas (Soñanez-Organis *et al.*, 2009).

Heidbreder *et al.*, (2003) proponen que las isoformas de *HIF-1 α* pueden contribuir a la protección durante intervalos tempranos y/o hipoxia moderada o en contra de severa y/o hipoxia prolongada. Al parecer un mecanismo de regulación por retroalimentación puede ocurrir en branquia y músculo, en el cual la elevación sostenida de la proteína *HIF-1 α* bajo hipoxia detona la señalización para la reducción de su mRNA correspondiente (Soñanez-Organis *et al.*, 2009).

Soñanez-Organis *et al.*, (2009) encontraron que los transcritos de *Hif1 α* fueron más altos que los de *Hif1 β* en branquia y músculo bajo normoxia e hipoxia. Los transcritos de *Hif1 α* fueron reducidos significativamente en branquia y músculo bajo las condiciones de hipoxia probadas; curiosamente, esta reducción parece ser dependiente del tiempo. La expresión de *Hif1 α* en hepatopáncreas del camarón *P. pugio* se expresa constitutivamente y no cambia bajo condiciones de hipoxia moderada y severa durante 3, 7 y 14 días de exposición (Soñanez-Organis *et al.*, 2009).

2.4.3 Genes involucrados en la capacidad osmorregulatoria de organismos marinos acuáticos

El camarón blanco es una especie que ha sido ampliamente cultivada en sistemas intensivos, extensivos y semi-intensivos. Debido a las enfermedades y la contaminación del agua en las costas, *L. vannamei*, ha llegado a ser un cultivo atractivo para mantenerse en granjas en algunas partes del mundo como son los Estados Unidos, Tailandia y China (Li *et al.*, 2009). El camarón blanco es un organismo eurihalino capaz de tolerar un amplio rango de salinidades que van de 0.5 a 40 psu, donde un cambio en la salinidad no afecta el rendimiento de su crecimiento ni la respuesta fisiológica debido al gasto energético destinado a la osmorregulación (Li *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2009).

La habilidad de osmorregular o la capacidad osmorregulatoria, en crustáceos es determinada por la osmolaridad de la hemolinfa (por ejemplo, la cantidad de osmolitos como Na⁺ y Cl⁻, expresados como miliosmoles kg⁻¹) en comparación con la del ambiente

en el que habitan. Cuando la osmolaridad ambiental es mayor que la de la hemolinfa se denomina hiperosmótico, y los crustáceos deben compensar el influjo de iones vía la hipoosmorregulación; por el contrario, cuando la osmolaridad ambiental es menor que la de la hemolinfa se denomina hipoosmótica, y los crustáceos deben compensar la pérdida de iones desde la hemolinfa vía la hiperosmorregulación. Incluso cuando la osmolaridad ambiental y la de la hemolinfa son iguales, los crustáceos acuáticos todavía osmorregulan hasta cierto punto, ya que la composición iónica de la hemolinfa puede ser significativamente diferente a la del ambiente (Romano y Zeng, 2012). Ésta capacidad osmoregulatoria también puede evaluarse midiendo la cantidad de iones disueltos en la hemolinfa, o bien por la actividad enzimática de la Na^+/K^+ ATPasa, así como por la evaluación de la expresión de la misma (Uranga, 2012).

Los crustáceos han adoptado dos estrategias para la osmorregulación predominantemente en branquia: el proceso compensatorio y el proceso limitante. El primero, es una estrategia por la cual el mantenimiento de los iones y osmolaridad en la hemolinfa es realizado mediante el movimiento activo de solutos dentro y fuera de la hemolinfa para balancear su difusión pasiva. En crustáceos decápodos los principales mecanismos conocidos son: la Na^+/K^+ ATPasa (localizada basolateralmente), co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ (localizado basolateral y apical-mente), ATPasa- H^+ tipo vacuolar (Tipo-V), $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$, e intercambiador Na^+/H^+ (localizados apicalmente) (Romano y Zeng, 2012). La Na^+/K^+ ATPasa es considerada una enzima importante que regula iones monovalentes (Na^+ , K^+ , Cl^- , los cuales constituyen el 90% del total de iones de la hemolinfa), además genera un gradiente electroquímico estimulando otros canales transportadores (Romano y Zeng, 2012).

El proceso limitante, por otra parte, es una estrategia donde el mantenimiento de los iones y osmolaridad de la hemolinfa es realizado mediante el ajuste de la permeabilidad de estructuras circundantes (por ejemplo, la membrana de las branquias), el cual puede ser un método altamente efectivo para reducir la difusión de iones y el influjo de agua, en lugar de depender únicamente de mecanismos más exigentes energéticamente, para el transporte de iones (Romano y Zeng, 2012).

La bomba de Na^+/K^+ es un tipo de bomba de protones impulsada por ATP presente en la membrana plasmática de las células eucariotas, la cual posee un amplio rango de funciones en procesos metabólicos. Esta bomba es una proteína transmembranal, localizada en la membrana basolateral de la branquia. Se cree que ésta genera el gradiente electroquímico para la absorción global de iones a través de la branquia de crustáceos, mediante el transporte activo de Na^+ desde el compartimento intercelular branquial hacia la hemolinfa (Freire *et al.*, 2008; Henry *et al.*, 2012).

Cuando *L. vannamei* es expuesto a agua de mar diluida, debe contrarrestar la pérdida de Na^+ mediante la absorción activa de Na^+ del ambiente a través de la membrana apical de sus células osmorregulatorias. Los iones de Na^+ son bombeados hacia la hemolinfa mediante la Na^+/K^+ ATPasa y se cree que este proceso es la parte central de la regulación iónica y balance de agua de vertebrados e invertebrados acuáticos (Li *et al.*, 2009). La actividad de la Na^+/K^+ ATPasa está directamente relacionada con la capacidad osmorregulatoria, donde una actividad alta generalmente indica una alta capacidad osmorregulatoria (Li *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2009).

La bomba de Na^+/K^+ transporta tres átomos de sodio del espacio intracelular hacia el espacio extracelular e importa dos átomos de potasio al lumen celular, utilizando la energía libre de Gibbs producida con la hidrólisis de ATP. Este transporte de iones permite que las células establezcan y mantengan el gradiente electroquímico necesario para conservar en homeostasis el volumen y el pH celular. Otro transportador de Na^+ del citosol hacia el espacio extracelular es la anhidrasa carbónica. La Na^+/K^+ ATPasa trabaja en conjunto con la anhidrasa carbónica para sacar Na^+ de la célula, y se ha encontrado que en baja salinidad se aumenta la expresión de la anhidrasa carbónica en cangrejos eurihalinos como *Callinectes sapidus* y *Carcinus maeñas* (Uranga, 2012).

Li *et al.*, (2009) determinaron que la Na^+/K^+ ATPasa se expresa principalmente en tejido de branquias. La branquias son consideradas el sitio primario para la regulación iónica y osmótica, por lo cual se encuentran involucradas en la respiración, osmorregulación y detoxificación (Soñanez-Organis *et al.*, 2009).

La branquia en crustáceos es un órgano multifuncional y es el sitio donde se llevan a cabo una gran cantidad de procesos fisiológicos incluyendo el intercambio gaseoso

(respiración), el transporte iónico (importante en la osmorregulación en hemolinfa), balance ácido-base, excreción de amonio, manutención de homeostasis osmótica y iónica, y la homeostasis de calcio, la cual presenta un importancia particular en los organismos que experimentan ciclos de muda y la detoxificación (Freire *et al.*, 2008; Henry *et al.*, 2012). Así mismo, la branquia también es una es una de las superficies externas más permeables en crustáceos (Li *et al.*, 2009).

El grado de expresión de la Na^+/K^+ ATPasa en otros tejidos como epitelio, pedúnculos oculares y hepatopáncreas, es relativamente bajo en comparación con la expresión en músculo y branquia (Li *et al.*, 2009). El hepatopáncreas es un órgano multifuncional que participa en la excreción, muda, metabolismo de lípidos y carbohidratos, síntesis y secreción de enzimas digestivas, absorción de nutrientes, síntesis de hemocianina y lipoproteínas y almacenaje de energía (Soñanez-Organis *et al.*, 2009).

Capítulo 3. Hipótesis

Si existen cambios en la respuesta fisiológica de *Litopenaeus vannamei* no ablacionados y ablacionados unilateral y bilateralmente, aclimatados a diferentes temperaturas ante la exposición a la temperatura crítica máxima, entonces ésta respuesta deberá observarse en la expresión de genes que regulan los mecanismos de adaptación involucrados en el mantenimiento de los procesos fisiológicos de este organismo.

Capítulo 4. Objetivos

4.1 Objetivo general:

Evaluar la respuesta de *Litopenaeus vannamei* a la exposición a la temperatura crítica máxima en organismos ablacionados unilateral y bilateralmente aclimatados a diferentes temperaturas mediante la expresión de genes en diferentes vías metabólicas y de algunas proteínas involucradas en la protección y mantenimiento celular.

4.2 Objetivos particulares:

- ❖ Validar genes de referencia para tejido de branquia en organismos aclimatados a diferentes temperaturas y en respuesta a exposición a TCM_{max}.
- ❖ Evaluar los niveles de expresión de los genes Hsp70 (Heat Shock Protein 70) y Hsp90 (Heat Shock Protein 90) involucrados en la protección de las proteínas en organismos aclimatados a diferentes temperaturas y en respuesta a exposición a TCM_{max}.
- ❖ Evaluar los niveles de expresión del gen Na⁺-K⁺ ATPasa (sodio-potasio ATPasa) involucrado en la regulación iónica y permeabilidad membranal, en organismos aclimatados a diferentes temperaturas y en respuesta a exposición a TCM_{max}.
- ❖ Evaluar los niveles de expresión del gen Hif-1 α (Factor Inducible de Hipoxia), involucrado en el mantenimiento y regulación de la glucólisis en organismos aclimatados a diferentes temperaturas y en respuesta a hipoxia durante exposición a TCM_{max}.

Capítulo 5. Metodología

5.1 Organismos experimentales

Se colocaron 150 organismos de camarón blanco en estanques de 2000 L con flujo continuo de agua de mar a 35 psu y se mantuvieron a una temperatura de 28 ± 1 °C con calentadores sumergibles de 1000 W. Los camarones permanecieron en estas condiciones y fueron alimentados dos veces al día con alimento de grado comercial (Aquaprofile Purina) con 35% de proteína hasta obtener un peso entre 10 y 12 g (Figura 2).



Figura 2. Estanques de 2000 L para mantención y crecimiento de organismos. a) Invernadero CICESE y b) Larvas de camarón blanco.

Una vez obtenido este peso húmedo, 50 camarones fueron colocados en estanques de 500 L ($n=150$), cada uno de ellos con recambio de agua y aireación constante. Los organismos se aclimataron durante 21 días a 3 temperaturas, 20, 26 y 32 ± 1 °C. Estas condiciones se mantuvieron con calentadores de 1000 W conectados a controladores de temperatura individuales. La alimentación se mantuvo a una tasa del 8% sobre el peso por espécimen (Figura 3).



Figura 3. Estanques de 500L de capacidad para la aclimatación a diferentes temperaturas de organismos experimentales.

5.2 Diseño experimental

Los organismos fueron ablacionados unilateral y bilateralmente, y se contó con organismos no ablacionados de los cuales se tomaron 5 como controles de aclimatación (A). El proceso de ablación se llevó a cabo de la siguiente manera:

Después del periodo de aclimatación en las diferentes temperaturas se tomaron 30 organismos y se ablacionaron unilateralmente (se cortó el pedúnculo ocular y se cauterizó). Estos organismos se devolvieron a su temperatura de aclimatación y se dejaron en reposo durante 7 días para su recuperación. Al cumplir el tiempo de recuperación se tomaron 15 de los 30 organismos ablacionados unilateralmente por temperatura y se realizó la ablación del segundo pedúnculo ocular. Estos organismos se colocaron separados de los unilaterales en los mismos estanques y se dejaron en reposo durante 7 días para su recuperación. Debido a que el proceso de ablación estresa al organismo estos fueron alimentados hasta dos días después de cada proceso de ablación (Figura 4).

Los organismos no ablacionados y los controles (A) se mantuvieron en las tres temperaturas de aclimatación durante el mismo tiempo que los organismos ablacionados.



Figura 4. Proceso de ablación de pedúnculo ocular realizado en *L. vannamei* (Fotos realizadas por la Dra. Denisse Re Araujo).

Posteriormente, al transcurrir el tiempo de recuperación del segundo proceso de ablación se procedió con el experimento de temperatura crítica máxima (TCM _{MÁX}).

Para ello primero se realizó un ensayo de sobrevivencia en el cual se colocaron 5 organismos en acuarios de 60 litros y se dejaron 15 minutos a la temperatura de aclimatación de acuerdo con Lutteschmidt y Hutchinson (1997 a y b). Posteriormente se fue aumentando la temperatura a una tasa de calentamiento de 1°C por minuto y los organismos se fueron retirando del experimento de TCM _{MÁX} cuando se observó pérdida del equilibrio (Loss of Righting Response o LRR), es decir cuando el camarón se inclina sobre su cefalotórax y no puede recuperar su postura de nado correcta o permanecen reclinados en 90° (González *et al.*, 2010; Re *et al.*, 2005); y al término del ensayo se

regresaron a su temperatura de aclimatación durante 96 horas para medir la supervivencia.

Pasado este lapso, se realizó el experimento de TCM_{max} con los organismos ablacionados y no ablacionados siguiendo la misma metodología del ensayo de supervivencia y se tomaron las muestras de tejido correspondientes (Figura 5).



Figura 5. Experimento de TCM_{max} y supervivencia realizados en acuarios de 60L.

5.2.1. Disección y colecta de tejidos.

Conforme los organismos fueron saliendo de los acuarios al llegar a su temperatura crítica máxima, se procedió con la disección para extraer tejidos. Se cortó con tijeras de punta delgada la parte superior de la cutícula del caparazón del cefalotórax, se abrió y se quitó la cutícula para tomar con unas pinzas de punta delgada tejido de la branquia, el cual se colocó en un tubo Ependorf de 1.5 ml con 800 μ l de solución casera para preservación de ácidos nucleicos (Buffer NAP) (Camacho-Sánchez *et al.*, 2013) (Anexo 2), previamente preparados y marcados (Figura 6).

Los tubos con tejido fueron mantenidos en hielo durante el muestreo y posteriormente fueron almacenados en cajas VWR® CryoPro® y colocados a -80°C.



Figura 6. Disección de tejido de branquia en organismos de *L. vannamei*

5.3 Búsqueda bibliográfica e informática

Se realizó una búsqueda bibliográfica de los genes involucrados en los procesos de regulación iónica, hipoxia y estrés térmico del camarón blanco en artículos relacionados y se seleccionaron los genes blanco para cada uno de los procesos como son Na^+/K^+ *ATPasa*, *Hsp70*, *Hsp90* y *Hif1 α* .

5.4 Genes de referencia

Para la normalización de la expresión de los genes de interés en este trabajo se seleccionaron cinco genes a partir de una búsqueda bibliográfica como posibles genes de referencia para *L. vannamei*: *Factor de elongación 1 alfa (Ef1 α)*, *Beta actina (β -actina)*, *Proteína ribosomal L8 (L8)*, *gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (gapdh)*, y el gen *ribosomal 18S (18S rRNA)*. Para el caso de los genes *L8*, *gapdh*, *ef1 α* y *18S rRNA* se diseñaron primers específicos a partir de las secuencias obtenidas del NCBI en el programa PerlPrimer.

Estos genes se seleccionaron de acuerdo con su participación en diferentes rutas metabólicas y procesos, minimizando de esta forma un posible efecto de co-regulación entre genes (Tabla 1). Se evaluó la estabilidad en la expresión de estos genes entre temperaturas de aclimatación y la condición de los organismos (controles (A), controles (TCMáx)- organismos no ablacionados sometidos a TCMáx y ablacionados unilateral y bilateralmente).

Tabla 1. Función de los genes de referencia evaluados.

Gen	Función celular
<i>Ef1α</i>	Traducción de proteínas, unión a proteínas del citoesqueleto, tumorigénesis, traducción de señales y apoptosis. Protección ante estrés oxidativo (Wang <i>et al.</i> , 2011).
β-actina	Motilidad, estructura e integridad celular. Involucrada en la organización del citoesqueleto celular. Proteína de expresión conservada en todos los tejidos animales durante el crecimiento y etapas de desarrollo (Sun <i>et al.</i> , 2007).
<i>Gapdh</i>	Deshidrogenasa, oxidoreductasa involucrada en la glucólisis y gluconeogénesis.
18srRNA	ARN estructural (involucrado en estructura del ribosoma). Síntesis de proteínas.
L8	Constituyente estructural del ribosoma subunidad 60s. Síntesis de proteínas.

5.5 Extracción de RNA, tratamiento con DNAsa y RT-PCR

Del tejido de branquia conservado a -80°C en Buffer NAP se utilizaron 100 mg para la extracción de RNA por 1 mL de Tri Reagent (SIGMA). La homogenización del tejido se realizó agregando 100 mg de perlas de cristal (SIGMA Glass beads, acid washed, 425-600 μm) en un homogenizador de tejidos. El RNA obtenido se resuspendió en agua DEPC 0.1% (el volumen dependió del tamaño del pellet entre 50 y 100 μL) y se cuantificó la concentración obtenida en cada extracción utilizando un espectrofotómetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific®). La calidad del RNA se evaluó a través de electroforesis en gel de agarosa al 1.0% bajo condiciones desnaturalizantes (Anexo 2).

De la solución de RNA total se tomaron 6 μg , los cuales fueron tratados con DNAsa I (RQI DNase, Promega) para eliminar contaminación por DNA genómico (gDNA). Para corroborar que el tratamiento con DNAsa fuera adecuado, se realizó una electroforesis

en gel de agarosa al 1.0% y se realizó un PCR en punto final con primers del gen 18s utilizando DNA complementario (cDNA) como control positivo (Anexo 1). Una vez confirmada la pureza del RNA se procedió con la transcripción reversa del mismo a cDNA. La síntesis de cDNA se llevó a cabo utilizando 1.0 µg de RNA tratado con DNAsa de cada organismo siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante del kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Anexo 1).

5.6 Análisis de expresión génica cuantitativa por PCR en tiempo real

Se utilizó cDNA obtenido mediante transcriptasa reversa de branquia de organismos no ablacionados (Controles (TCMáx)), ablacionados unilateral y bilateralmente, así como controles (A) para el análisis de expresión génica cuantitativa por PCR en tiempo real (qPCR), evaluando la expresión de los genes *Hsp70*, *Hsp90*, *Hif1α* y *Na⁺/K⁺ ATPasa*.

El PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) es una tecnología que posee la capacidad de detectar y medir cantidades diminutas de ácidos nucleicos en un amplio rango de muestras de numerosas fuentes mediante la detección de una señal de fluorescencia producida proporcionalmente durante la amplificación del DNA blanco (Bustin *et al.*, 2005; Bustin *et al.*, 2009). El qPCR determina el punto en el tiempo (ciclo de PCR) donde la amplificación del producto blanco es detectada inicialmente (Wong y Medrano, 2005). Este valor actualmente se denomina ciclo de cuantificación (Cq) y se define como el tiempo al cual la intensidad de la fluorescencia es mayor a la fluorescencia de fondo (Bustin *et al.*, 2009). El valor de Cq se determina en la fase exponencial de la reacción de PCR y es inversamente proporcional al número de copias del blanco dando como resultado valores bajos de Cq (Bustin *et al.*, 2005).

Entre mayor sea el número de copias inicial del ácido nucléico blanco, se observará un incremento significativamente rápido en la fluorescencia. Esta correlación lineal entre el producto de PCR y la intensidad de la fluorescencia se utiliza para calcular la cantidad de templado presente al inicio de la reacción (Bustin *et al.*, 2005).

Existen dos métodos para analizar los datos de PCR cuantitativo en tiempo real: la cuantificación absoluta y la relativa. La cuantificación relativa describe los cambios en la expresión del gen blanco con relación al grupo de referencia, que para este caso, serán

los genes especificados en la sección 5.4 que cumplan con las condiciones de gen de referencia, como se describe en la sección 5.6.2 (Livak y Schmittgen, 2001).

5.6.1 Estandarización de la eficiencia de amplificación por qPCR.

La eficiencia (e) del qPCR se determinó de acuerdo a Pfaffl (2001) para cada par de primers-cebadores de los diferentes genes evaluados, de referencia y blanco de interés en este trabajo. Se obtuvo una curva estándar para cada gen de referencia así como para los cuatro genes blanco. La amplificación se realizó por triplicado en cada una de las cuatro diluciones seriadas (1:5) utilizando el cDNA de muestras de branquia a partir de un pool realizado con RNA tratado con DNAsa de organismos de las diferentes condiciones y temperaturas de aclimatación. Los análisis se realizaron en el termociclador en tiempo real CFX96 (Bio-Rad) y se utilizó como intercalante fluorescente IQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad).

Las concentraciones finales de reacción fueron: 1x IQ™ SYBR® Green Supermix (5 μ L) (Anexo I), 0.3 μ M de oligonucleótidos (forward y reverse 10 μ M) para genes de referencia y 0.2 μ M para genes blanco, 3 μ L de cDNA (Dilución 1:5) y H₂O libre de RNAsas en un volumen final de 10 μ L. Las condiciones de amplificación consistieron en: 2 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15s y, alineamiento y extensión a 60°C por 30s, así como un paso de extensión adicional a 72°C durante 5 min. También se agregó un análisis de curva de disociación con una desnaturalización a 95°C por 10s, disociación de 65-95°C por 5s con un incremento de 0.5°C. Como control negativo se utilizó H₂O libre de nucleasas.

Para el caso del gen *Hif1 α* se utilizaron las mismas condiciones de reacción utilizadas para los demás genes blanco, sin embargo, las condiciones de amplificación utilizadas fueron las reportadas por Soñanez-Organis *et al.*, (2009) y consistieron en: 5 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30s, alineamiento a 60°C por 35s y extensión a 72°C por 55s. Así mismo se agregó una curva de disociación con desnaturalización a 95°C por 10s, disociación de 60-95°C por 5s con un incremento de 0.5°C.

5.6.2 Validación de los genes de referencia para el análisis en muestras de branquia de organismos con diferentes condiciones y temperaturas de aclimatación

Para que un gen sea válido como gen de referencia su expresión no debe variar en los tejidos o células que se estén investigando. El gen control interno ideal es universalmente válido, con un nivel de expresión constante a través de todos los tejidos, células, tratamientos y diseños experimentales (Andersen *et al.*, 2004). Sin embargo, la literatura muestra que no existe un gen de referencia ideal y que los genes de referencia pueden variar considerablemente dependiendo de las condiciones experimentales (Vandesompele *et al.*, 2002). Por lo tanto la validación de los genes de referencia en este estudio es importante para evaluar la estabilidad de los genes elegidos ante las diferentes condiciones de los organismos (ablacionados y no ablacionados), el tipo de tejido, la temperatura de aclimatación y la exposición al experimento de TCMáx.

La selección de los genes de referencia se llevó a cabo mediante la evaluación de la estabilidad en su expresión. Esta expresión se evaluó en 12 pools (3 organismos/pool) de cDNA (1:5) de branquia de camarones con diversas condiciones y temperaturas de aclimatación.

Para calcular la estabilidad de la expresión de cada gen de referencia se utilizaron los valores de Cq promedio obtenidos, y se evaluaron mediante los programas *Genorm*, *Normfinder* y *Bestkeeper*.

También se realizó un análisis en la herramienta *RetFinder* de Cotton EST Database East Carolina (<http://www.leonxie.com/referencegene.php>) para corroborar los datos obtenidos con los programas por separado. Esta plataforma es una herramienta que permite evaluar genes de referencia a partir de un número extenso de datos. Integra los tres principales programas mencionados anteriormente y el método comparativo delta Ct (ΔCt) para comparar y clasificar los genes de referencia evaluados. Posteriormente basado en la jerarquía obtenida en cada programa, asigna un valor a cada gen individual y calcula la media geométrica de los valores para obtener una clasificación final para los genes evaluados.

El algoritmo de *Genorm* calcula la estabilidad de la expresión génica (Valor M) para cada gen basado en la proporción relativa de la expresión promedio por pares para cada uno de los genes en el análisis. Un gen que muestra un alto valor de M presenta una gran variación en su expresión. Posteriormente, *Genorm* estima el factor de normalización (NF) utilizando la media geométrica de los niveles de expresión de los n mejores genes de referencia, utilizando la variación por parejas (V) con un valor de 0.15 como umbral. Este valor V indica el número de genes que deben ser utilizados para la normalización de los genes blanco (Vandesompele *et al.*, 2002).

Normfinder es un modelo basado en la estimación de la varianza, el cual calcula los valores de la estabilidad de la expresión (SV) para cada gen analizado. Permite la estimación de la variación global de los genes de referencia tomando en cuenta las variaciones intra e inter grupales dentro de un conjunto de muestras. De acuerdo con este algoritmo los genes con menor SV serán los genes más estables (Andersen *et al.*, 2004).

Bestkeeper es una herramienta que calcula la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV) basado en los valores de los ciclos de cuantificación (Cq) de todos los genes de referencia candidatos. Los genes de referencia con valores SD mayores a 1 pueden ser considerados como inconsistentes y deberán ser excluidos. Y al contrario los genes con el menor valor SD son considerados como los más estables. *Bestkeeper* estima la correlación inter-genes de todos los pares de genes de referencia, prediciendo el coeficiente de correlación de Pearson (r) y el valor de la probabilidad (p) para cada correlación (Figueiredo *et al.*, 2013).

5.6.3 Cuantificación relativa de la expresión de los genes *Hsp70*, *Hsp90*, *Hif1 α* y *Na⁺/K⁺ ATPasa*.

La expresión de los genes *Hsp70*, *Hsp90*, *Hif1 α* y *Na⁺-K⁺ ATPase* se analizó en tejido de branquia de camarones no ablacionados y ablacionados unilateral y bilateralmente, aclimatados a 20°C, 26°C y 32°C.

El valor de la expresión relativa normalizada se estimó por medio del programa *qBase^{PLUS}*, v2.0 (Biogazelle, Bélgica). Este programa utiliza un algoritmo modificado a

partir del método delta-delta-Ct ($\Delta\Delta Ct$), tomando en cuenta la eficiencia de amplificación para cada gen tanto blanco como de referencia, y estima las cantidades relativas de expresión génica normalizada (NRQs: *Normalized relative quantities*) a partir de los valores de Cq utilizando un modelo que normaliza a los genes blanco con base en los genes de referencia seleccionados por su estabilidad (Hellemans *et al.*, 2007).

5.7 Análisis estadísticos

En todos los análisis se empleó el programa STATISTICA versión 7.1 mediante el cual se evaluó la normalidad (Prueba de Shapiro-Wilk) y la homocedasticidad de varianzas (Prueba de Hartley, Cochran y Bartlett) de los datos obtenidos.

5.7.1 Análisis de la temperatura crítica máxima

Se realizó un análisis de varianza de dos vías (MANOVA) para evaluar las diferencias en la temperatura crítica máxima de los organismos no ablacionados y ablacionados unilateral y bilateralmente aclimatados a tres diferentes temperaturas.

Se analizaron las medias de la temperatura crítica máxima mediante una prueba *a posteriori* de Tukey para establecer la existencia de diferencias significativas entre los factores (Condición y Aclimatación). Se utilizó una significancia estadística de $P < 0.05$.

5.7.2 Análisis de la expresión génica.

Se realizó un análisis de varianza de dos vías (MANOVA) para evaluar el efecto de la condición y aclimatación en los niveles de expresión de los genes blanco seleccionados (*Hsp70*, *Hsp90*, *Hif1 α* y *Na⁺-K⁺ ATPasa*) en los organismos no ablacionados y ablacionados unilateral y bilateralmente, aclimatados a tres diferentes temperaturas y sometidos a experimento de TCM_{máx}. Las diferencias en las medias de la expresión génica fueron evaluadas utilizando la prueba *a posteriori* de Fisher con un nivel de significancia estadística $P < 0.05$ en todos los casos.

Capítulo 6. Resultados

6.1 Organismos experimentales y tejidos obtenidos

De los organismos experimentales aclimatados a 20°C, 26°C y 32°C sometidos al ensayo de supervivencia se obtuvo una tasa de supervivencia del 95%. De los organismos sometidos a experimento de TCM_{máx} se obtuvo un total de 127 organismos experimentales. A continuación se muestra una tabla de los organismos obtenidos bajo las distintas condiciones para cada temperatura de aclimatación.

Tabla 2. Organismos totales obtenidos a partir del experimento de TCM_{máx} por cada temperatura de aclimatación.

Condición	Temperaturas			Total
	20°C	26°C	32°C	
Controles (A)	5	5	5	15
A. Unilaterales	15	10	15	40
A. Bilaterales	6	13	8	27
Controles (TCM _{máx})	15	15	15	45
Total	41	43	43	127

Nota: (-) Indica los organismos experimentales de los cuales aún no se ha realizado el experimento de TCM_{máx}.

De la disección realizada a estos organismos experimentales se obtuvo un total de 127 muestras de tejido de branquia, los cuales se mantuvieron almacenados en Buffer NAP a -80°C hasta realizarse la extracción de RNA.

6.2 Temperatura Crítica Máxima

La mayoría de los organismos experimentales fueron machos ya que en Re *et al.*, reportan en estudios anteriores que no existen diferencias significativas en la temperatura crítica máxima de organismos juveniles de *Litopenaeus vannamei* con respecto al sexo.

Los organismos ablacionados unilateralmente y aclimatados a 20°C presentaron una temperatura crítica máxima promedio de 33.9°C ± 0.79 (Media ± DS), los aclimatados a 26°C de 37.4°C ± 0.59 y los aclimatados a 32°C de 41.4°C ± 0.45.

En los organismos ablacionados bilateralmente la temperatura crítica máxima promedio obtenida para los organismos aclimatados a 20°C fue de 33.3°C ± 0.52, para los aclimatados a 26°C de 36.6°C ± 0.70 y para los aclimatados a 32°C de 40.5°C ± 0.88.

En cuanto a los organismos no ablacionados se obtuvo una temperatura crítica máxima promedio para los organismos aclimatados a 20°C de 36.4°C \pm 0.92, para los aclimatados a 26°C de 38.1°C \pm 0.26 y de 41.0°C \pm 0.52 para los aclimatados a 32°C.

Se observó que existe una reducción en la tolerancia térmica de los organismos ablacionados unilateral y bilateralmente aclimatados a 20°C y 26°C, así como de los ablacionados bilateralmente aclimatados a 32°C con respecto a los organismos no ablacionados de las tres temperaturas de aclimatación. Para el caso de los organismos ablacionados unilateralmente aclimatados a 32°C se pudo observar un aumento en la tolerancia térmica con respecto a los organismos no ablacionados aclimatados a la misma temperatura (Figura 7).

Con los valores del alcance de tolerancia térmica para cada grupo de organismos de acuerdo con su temperatura de aclimatación y condición, se pudo observar que existe una relación inversamente proporcional entre la temperatura de aclimatación versus el alcance de la tolerancia térmica, en donde los organismos aclimatados a temperaturas más bajas presentan una mayor tolerancia térmica en comparación con los organismos aclimatados a temperaturas más altas. Por otra parte también se observó que la ablación también juega un papel importante en la tolerancia térmica de los organismos ya que también reduce el alcance de tolerancia térmica de los organismos al ser sometidos al experimento de TCM_{máx} (Tabla 3).

Tabla 3. Alcance de tolerancia térmica de los organismos sometidos a TCM_{máx} bajo las diferentes temperaturas de aclimatación y condición.

	20°C	26°C	32°C
Unilaterales	13.9°C	11.4°C	9.4°C
Bilaterales	13.3°C	10.6°C	8.5°C
No ablacionados	16.4°C	12.1°C	9.0°C

Mediante un análisis de varianza de dos vías se evaluó estadísticamente que las diferencias analizadas mediante los valores de las medias para cada condición y temperatura de aclimatación fueran altamente significativas entre ambos factores (aclimatación y condición) de los organismos sometidos a experimento de TCM_{máx} en el programa *Statistica 7* y se observó que existen diferencias altamente significativas con

$P < 0.001$ en la $TCM_{\text{máx}}$ de los organismos experimentales con respecto a su condición versus la temperatura de aclimatación (Figura 7).

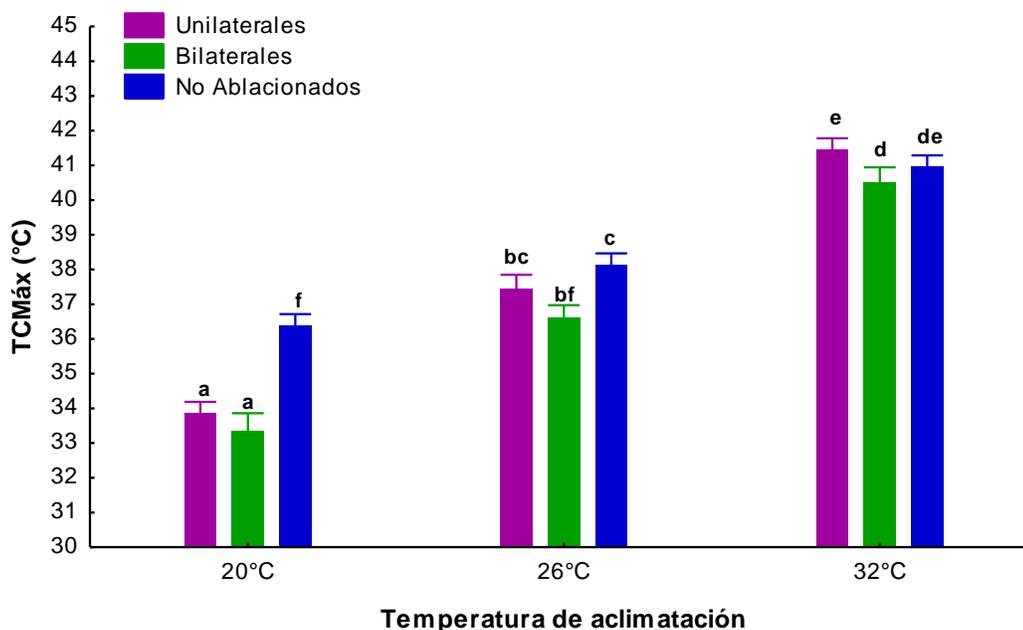


Figura 7. Análisis de varianza de dos vías de la $TCM_{\text{máx}}$ obtenida de los organismos experimentales. (Las letras indican la condición versus la aclimatación en las cuales no se encontraron diferencias altamente significativas $p > 0.05$). Las líneas con desviaciones denotan los intervalos de confianza (0.95) para cada media.

Mediante una prueba *a posteriori* de Tukey se observó que no existen diferencias altamente significativas $P > 0.05$ en la temperatura crítica máxima de los organismos ablacionados unilateralmente versus los ablacionados bilateralmente a 20°C; los ablacionados bilateralmente a 26°C versus los no ablacionados a 20°C y los ablacionados unilateralmente a 26°C, los no ablacionados versus los ablacionados unilateralmente a 26°C; y los no ablacionados a 32°C versus los ablacionados unilateral y bilateralmente a la misma temperatura de aclimatación (Tabla 4 y Figura 7).

6.3 Búsqueda bibliográfica y bioinformática

Se identificó la función celular que desempeñan cada uno de los genes blanco evaluados en este estudio y se muestran a continuación en la tabla 5.

Tabla 4. Prueba *a posteriori* de Tukey para evaluar las significancias en la temperatura crítica máxima de los organismos experimentales. AU: Ablacionados unilateralmente; AB: Ablacionados bilateralmente; NA: No ablacionados.

Aclimatación	Condición	AU	AB	NA	AU	AB	NA	AU	AB	NA
		20°C	20°C	20°C	26°C	26°C	26°C	32°C	32°C	32°C
		33.853	33.333	36.380	37.440	36.615	38.133	41.447	40.487	40.953
20°C	AU		0.7736	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
20°C	AB	0.7736		0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
20°C	NA	0.0001	0.0001		0.0040	0.9891	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
26°C	AU	0.0001	0.0001	0.0040		0.0767	0.1970	0.0001	0.0001	0.0001
26°C	AB	0.0001	0.0001	0.9891	0.0767		0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
26°C	NA	0.0001	0.0001	0.0001	0.1970	0.0001		0.0001	0.0001	0.0001
32°C	AU	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001		0.0289	0.4970
32°C	AB	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0289		0.7845
32°C	NA	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.4970	0.7845	

- En rojo se muestran los grupos que no presentaron diferencias altamente significativas.

Tabla 5. Función de los genes involucrados en regulación iónica, hipoxia y estrés térmico del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

Gen	Funciones celulares
ATPasa Na⁺-K⁺	Balance hidrosalino, regulación iónica y osmótica.
Hif1α	Regulador de algunos genes involucrados en la respuesta a Hipoxia para potenciar la sobrevivencia (Cai <i>et al.</i> , 2014). Regulador de la homeostasis del oxígeno celular y respuesta adaptativa a la falta de oxígeno (Hardy <i>et al.</i> , 2012).
Hsp70	Primer respuesta del organismo ante estrés. Protección a la célula por el daño causado por el estrés térmico agudo. Biogénesis de proteínas y plegamiento de proteínas desnaturalizadas.
Hsp90	Regulación de rutas celulares esenciales mediante activación de cientos de proteínas como cinasas, factores de transcripción y receptores esteroides (Luan <i>et al.</i> , 2009). Respuesta ante estrés por temperatura y pH, mediante la reducción de la agregación de proteínas desnaturalizadas o proteínas agregadas marcadas para degradación (Luan <i>et al.</i> , 2009).

Se diseñaron primers específicos para cinco de los nueve genes seleccionados tanto de referencia como blanco. Se utilizaron las secuencias disponibles en la base de datos del NCBI y se utilizó el programa Perlprimer para realizar el diseño de cada uno de los primers para este estudio.

Los primers fueron diseñados con base en las siguientes especificaciones: porcentaje de GC del 40 al 60%, tamaño entre 18 y 24 bases, Tm para cada primer forward y reverse no mayor a 64°C y diferencia entre Tm's para cada par de primers no mayor a 3°C, terminación o inicio de primer con una base púrica, no formación de estructuras

secundarias o dímeros y tamaño de amplicon entre 100-200 pb. A continuación se muestra cada uno de los primers diseñados, así como aquellos diseñados por otros autores y que fueron utilizados en este estudio (Tabla 6).

Para la revisión de cada una de las secuencias de los genes de este estudio y el alineamiento de secuencias con los primers se utilizó el programa BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.2.0 (Tom Hall, Ibis Biosciences).

6.4 Extracción de RNA

Se realizaron un total de 127 extracciones de tejido de branquia, las cuales fueron cuantificadas obteniéndose en promedio $69.3 \mu\text{g} \pm 27.1$ de RNA total por muestra. Así mismo, se midió la relación A260/280 para verificar la pureza del RNA obtenido y A260/A230 para verificar que no existiese contaminación por proteínas, fenoles u otros contaminantes. Estas relaciones se mantuvieron entre 1.8-2.0 y 1.6-1.8, respectivamente.

Se realizaron electroforesis desnaturalizantes en gel de agarosa al 1.0% para el 30% de las muestras de RNA obtenidas del tejido de branquia para verificar la calidad del RNA extraído. En estos geles se observaron las bandas pertenecientes a 18S y 28S rRNA. Las bandas pertenecientes a 28s rRNA fueron menos intensas que las de 18S y en algunos casos no se observaron las pertenecientes a 28S. Este fenómeno es común en algunos insectos y en camarones e inicialmente se le conocía como “Hidden Break” y en la actualidad como “Gap Deletion”. Este fenómeno ocurre cuando un tramo corto de nucleótidos son removidos de las moléculas de los 28S rRNA maduros y se crean 2 subunidades (28S α y 28S β). Al realizarse la electroforesis desnaturalizante las dos subunidades o una parte de ellas migran en conjunto con el 18S rRNA observándose un perfil de bandeo diferente, en el cual la banda del 18S es más intensa. El “break” se genera por la escisión de ese tramo corto de nucleótidos conocido como región Gap de los precursores del rRNA y al cual se debe su nombre actual (Sun *et al.*, 2012).

En la mayoría de las muestras no se observó degradación en el RNA, como se puede observar a continuación en la figura 8. Para los análisis siguientes, se eligieron las muestras que no presentaron degradación.

Tabla 6. Secuencias de los oligonucleótidos-primers de los genes de referencia y blanco. pb: pares de bases; GC: porcentaje de Guanina-Citocina; Tm': temperatura de disociación calculada; T: temperatura de alineamiento; Cq: ciclo de cuantificación mínimo de la curva estándar; Tm: temperatura de disociación; e: eficiencia.

Genes	Genbank No. Acceso	Secuencia Forward/Reverse (5'→3')	Posición	Tamaño	Producto (pb)	GC (%)	Tm' (°C)	T (°C)	Cq	Tm (°C)	E
Beta actina: β-actina (Zhou et al.,2008)	AF300705	GCCCATCTACGAGGGATA GGTGGTCGTGAAGGTGTAG	563-580 665-683	18 bases 19 bases	121	55 52	57.6 59.7	60	22.18	86	1.839
Factor de elongación 1 alfa: LvEF1α_LLLG (PerlPrimer)	GU136229	GAAATCCGACAACATGGGCT CCAATCTTGTACACGTCCTG	654-673 796-815	20 bases 20 bases	162	50 50	61.2 58.7	60	23.43	85.5	1.803
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa: LvGAPDH_LLLG (PerlPrimer)		TCGGCAAGGAGTGCTCTTAT GCCTTAGCGTCAAAGATGGA	3-22 134-153	20 bases 20 bases	151	50 50	61.5 60.6	60	24.52	87	1.906
RNA 18s ribosomal: Lv18srRNA_LLLG (PerlPrimer)	AF186250	ATGATTAATAGAAGCAGACGGG GTATCTGATCGCCTTCGAACC	578-599 708-728	22 bases 21 bases	151	40 52	58.2 61.1	60	26.15	83	1.874
Proteína ribosomal L8: LvL8_LLLG (PerlPrimer)	DQ316258	ATGAACCTGTAGAGCATCCTC CTTTGTACCACGGATGAGACCA	651-672 770-791	22 bases 22 bases	141	50 50	61.8 62.5	60	22.40	83	1.929
Heat Shock Protein 70: Hsp70 (Qian et al.,2012)	AY645906	CTCCTGCGTGGGTGTGTT GCGGCGTCACCAATCAGA	49-66 151-168	18 bases 18 bases	120	61 61	62.7 63.2	60	27.61	86.5	1.973
Heat Shock Protein 90: LvHsp90_LLLG (PerlPrimer)	HQ008268	CGAAGGAGAACCAGAAGCAC TGCTGAACGCAGTATTCGTC	1520-1539 1745-1664	20 bases 20 bases	145	55 50	61.2 61.2	60	28.15	84.5	1.908
ATPasa sodio/potasio: Na⁺/K⁺ Atpase (Li et al.,2009; Li et al.,2011)	HM626274	AGCAAGGCCATCAACGATCT GCCCACTGCACAATCACAAT	1798-1817 1900-1919	20 bases 20 bases	122	52 50	64.7 62.0	60	26.58	82	1.862
Factor inducible de hipoxia: HIFrt (Soñanez-Organis et al., 2009)	FJ807918	GGAGTCTTTGAGAGAGAG GCCTCCTTCCGTGATCTTC	210-227 381-391	18 bases 19 bases	182	50 57	53.3 60.3	60	27.18	85	1.873

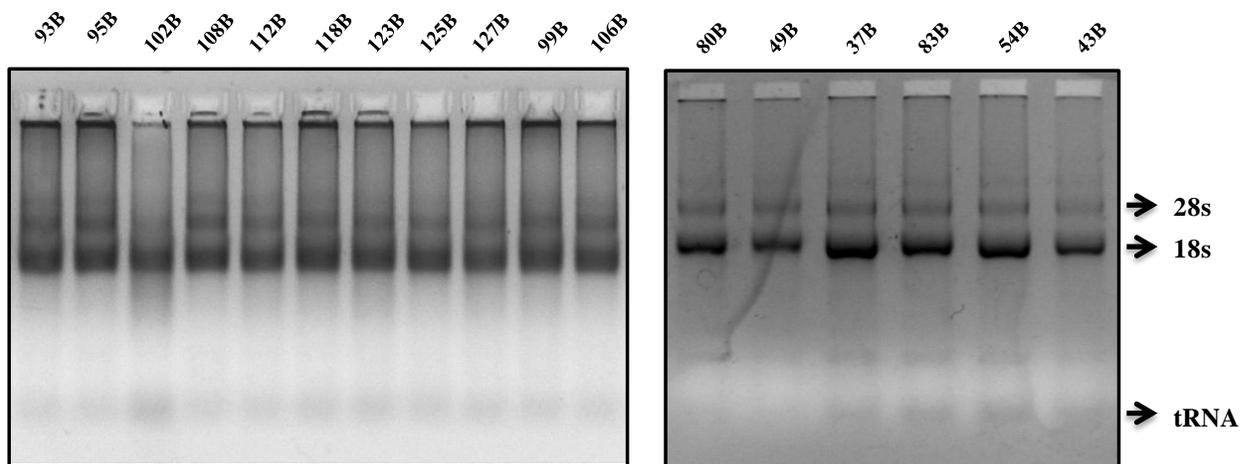


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de algunas de las muestras de RNA obtenidas a partir del tejido de branquia. El gel se corrió a 80 volts durante 50 minutos.

6.4.1 Purificación del RNA

Se purificaron inicialmente 18 muestras de RNA para corroborar la estandarización del protocolo de purificación de RNA (tratamiento con DNAsa I). Mediante esta estandarización se obtuvo una pérdida entre el 10 y 30% del RNA purificado y mediante electroforesis desnaturizante en gel de agarosa al 1.0% se verificó la pureza y calidad del RNA de las muestras. En la figura 9 se puede observar el gel perteneciente a algunas de las muestras tratadas con DNAsa.

Así mismo como un paso extra de verificación se realizó un PCR punto final con RNA como templado de las muestras purificadas. Donde en caso de existir amplificación indicaría la existencia de DNA genómico, el cual se busca eliminar mediante esta etapa de purificación. Para cada una de las muestras tratadas no se observó amplificación, como puede observarse en la figura 10, lo que indica que no hay presencia de DNA que pueda ser amplificado. En la tabla 7 se muestran las condiciones para la preparación de la reacción, así como el programa utilizado para el termociclador en punto final.

Finalmente se realizó un total de 127 purificaciones de RNA y se verificó su calidad e integridad.

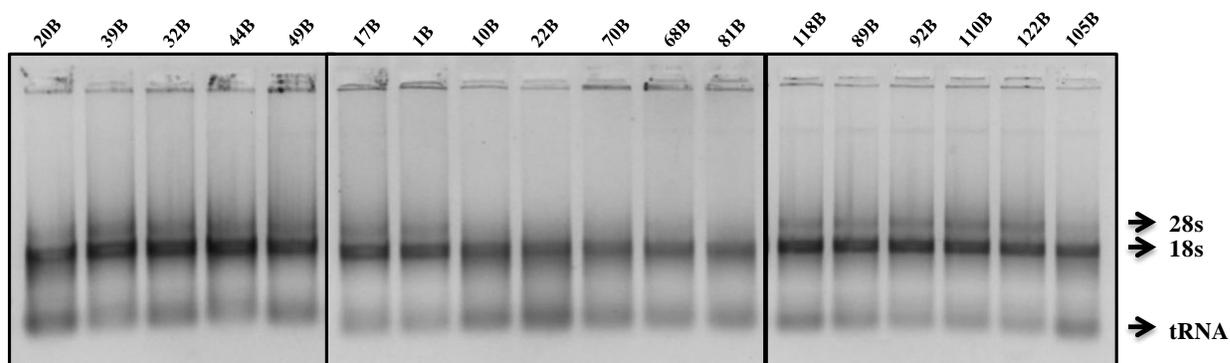


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para verificar la efectividad del tratamiento con DNAsa y calidad de RNA. El gel se corrió a 80 volts durante 50 min.

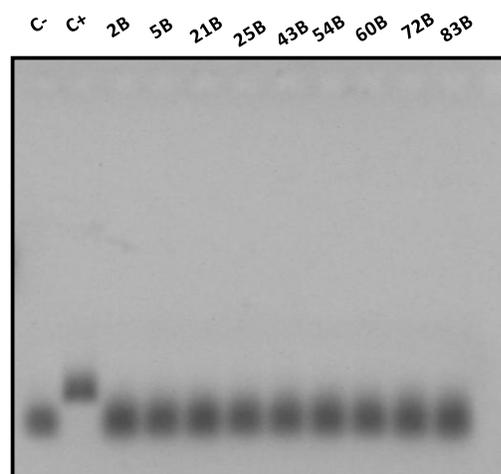


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del PCR punto final para verificar tratamiento con DNAsa de las muestras de RNA extraídas.

Tabla 7. Condiciones de la reacción de PCR con primers del gen 18s y programa utilizado en el termociclador para verificar el tratamiento con DNAsa.

Mix	[Final]	Programa		
Go Taq Flexi Buffer (2X)	1x	95°C	2'	1 ciclo
MgCl ₂ (25mM)	4 mM	95°C	45"	} 35 ciclos
dNTPs (10 mM)	0.4 mM	60°C	45"	
F (10 µM)	0.16 µM	72°C	30"	
R (10 µM)	0.16 µM	72°C	5'	1 ciclo
Go Taq DNA polimerasa (5u/µL)	0.05 u/µL	4°C	∞	
Templado (cDNA-C+) / (RNA)	50-100 ng / >500 ng			
H ₂ O Libre de nucleasas	Variable			
Volúmen total	25 µL			

6.4.2 Síntesis de cDNA

Se realizaron un total de 163 cDNAs con el kit ImProm-II™ Reverse Transcription System a partir de 1 µg de RNA total para cada uno. Estos cDNAs fueron utilizados para realizar los pooles para la evaluación de los genes de referencia (12 pooles de 3 organismos cada uno) y expresión relativa de genes blanco (60 pooles de 2 organismos cada uno).

6.5 Estandarización de genes de referencia y blanco en PCR punto final

Se estandarizaron en PCR punto final los genes *18S rRNA*, *β-actina*, *gapdh*, *Ef1α*, *L8*, *Hsp70*, *Na⁺/K⁺ ATPasa* y *Hsp90*. Para la estandarización se utilizó un pool de cDNA proveniente de muestras de organismos experimentales y controles. Primero se realizó un gradiente de temperatura de 56-62°C de acuerdo con las condiciones de reacción que se muestran en la tabla 8 y se determinó mediante electroforesis desnaturante en gel de agarosa al 1.5% la temperatura de alineamiento óptima para cada par de primers por gen (Figura 11 y 12). Las condiciones de amplificación finales del termociclador Veriti™ Thermal Cycler de Applied Biosystems fueron: 95°C por 2 min, seguido de 35 ciclos a 95°C por 45s, 60°C por 45s y 72°C por 30s, 72°C 5 min y 4°C ∞. Se obtuvieron los tamaños esperados para cada par de primers.

Para el caso de los genes blanco se realizó un gradiente de temperaturas de 54-60°C obteniéndose los fragmentos del tamaño esperado. Para la amplificación de estos genes se utilizaron las mismas condiciones de reacción de los genes de referencia (Tabla 8) bajando únicamente la concentración final de primers a 0.2 µM. Las condiciones de amplificación fueron las mismas estandarizadas para los genes de referencia (Figura 12).

La estandarización del gen *Hif1α* se realizó directamente en qPCR debido a que las condiciones para su amplificación ya se encontraban en Soñanez-Organis *et al.*, (2009). Se obtuvieron las curvas de eficiencia de cada uno de los genes blanco y de referencia elegidos.

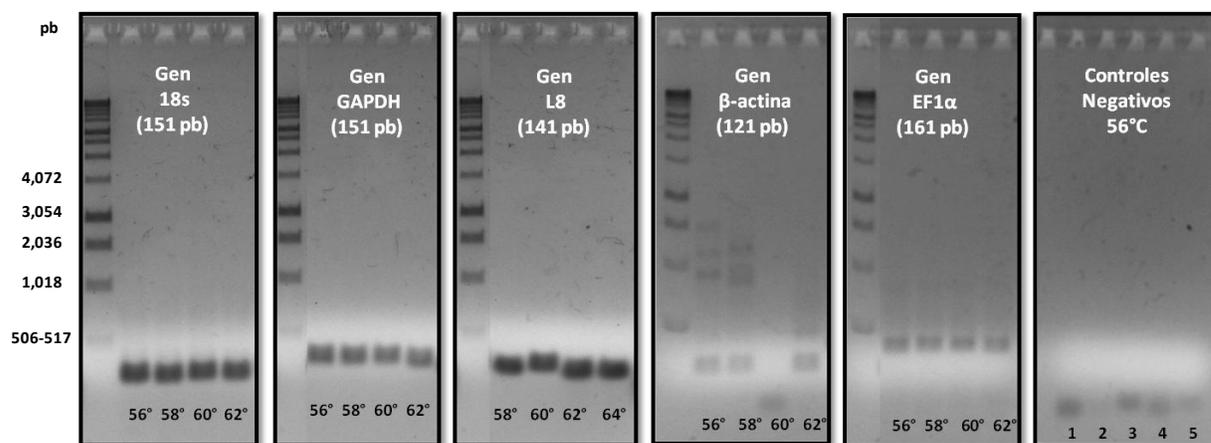


Figura 11. Gradiente de temperatura realizado para los genes de referencia con las condiciones de reacción y programa del termociclador utilizados (Gel de agarosa al 1.5%, 60 minutos a 80 volts).

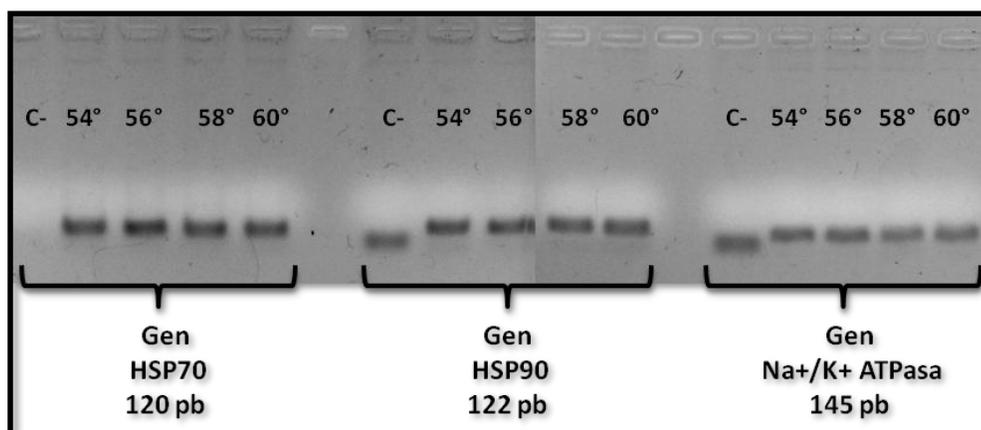


Figura 12. Gradiente de temperatura realizado para los genes *Hsp70*, *Hsp90* y *Na⁺/K⁺ ATPasa* (Gel de agarosa al 1.5%, 50 minutos a 80 volts).

Tabla 8. Condiciones de la reacción de PCR punto final para los genes de referencia.

Mix	[Final]
Go Taq Flexi Buffer (2X)	1x
MgCl ₂ (25mM)	4 mM
dNTPs (10 mM)	0.4 mM
F (10 μM)	0.3 μM
R (10 μM)	0.3 μM
Go Taq DNA polimerasa (5u/μL)	0.05 u/μL
Templado (cDNA)	50-100 ng
H ₂ O Libre de nucleasas	Variable
Volumen total	15 μL

6.6 Estandarización de primers en qPCR

Se obtuvieron las curvas de eficiencia para cuatro de los cinco genes de referencia elegidos. Se descartó el gen *18S rRNA* debido a que la primera dilución que debía realizarse era 1:200 y con ello se podía obtener valores de C_q similares a los demás genes evaluados. Sin embargo, ya desde un inicio podemos observar que existe una amplia variación en la cantidad de transcrito inicial. Por lo que no fue tomado en cuenta para este estudio.

Para el gen *L8* se obtuvo una eficiencia del 92.9% (1.929) y $r^2 = 0.997$ con valores de C_q promedio mínimo y máximo de 14.96 y 22.40, respectivamente (Figura 14b). En la curva de disociación no se detectaron productos inespecíficos ni la formación de dímeros. La T_m del fragmento obtenido fue de 83°C (Figura 13a).

En la figura 14a se muestra la curva estándar del gen *Ef1 α* del cual se obtuvo una eficiencia del 80.3% (1.803) con $r^2 = 0.997$. Los valores de C_q promedio mínimo y máximo fueron de 15.02 y 23.43, respectivamente. En la curva de disociación se obtuvo un fragmento con una T_m de 85.5°C y no se detectaron productos inespecíficos (Figura 13c).

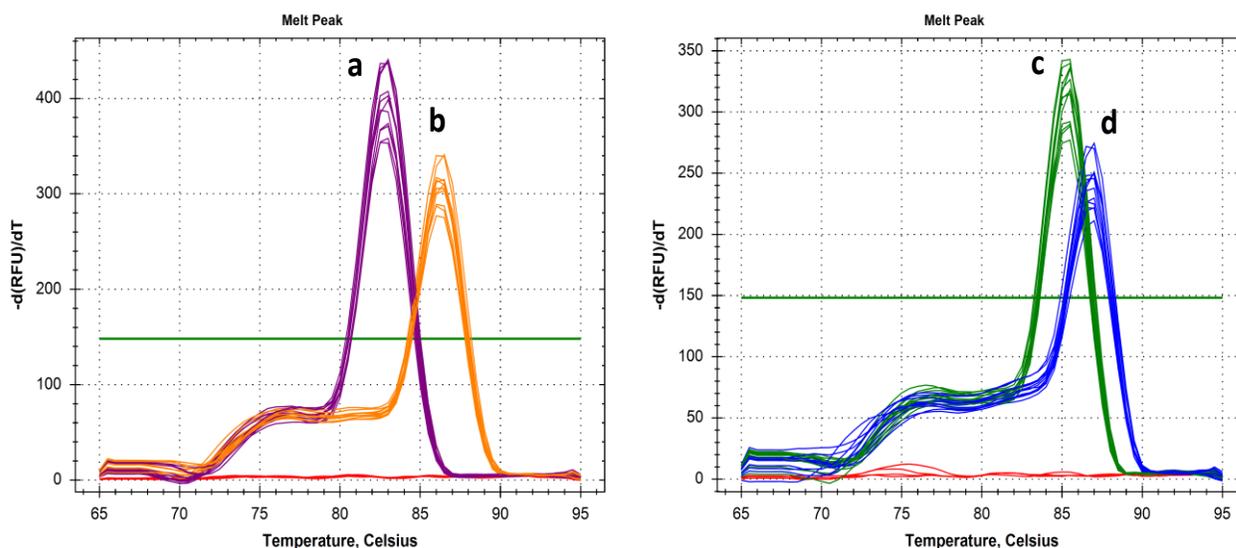


Figura 13. Picos de disociación obtenidos mediante la curva de disociación para cada uno de los genes de referencia evaluados. a) *L8*, b) *β -actina*, c) *Ef1 α* y d) *gapdh*

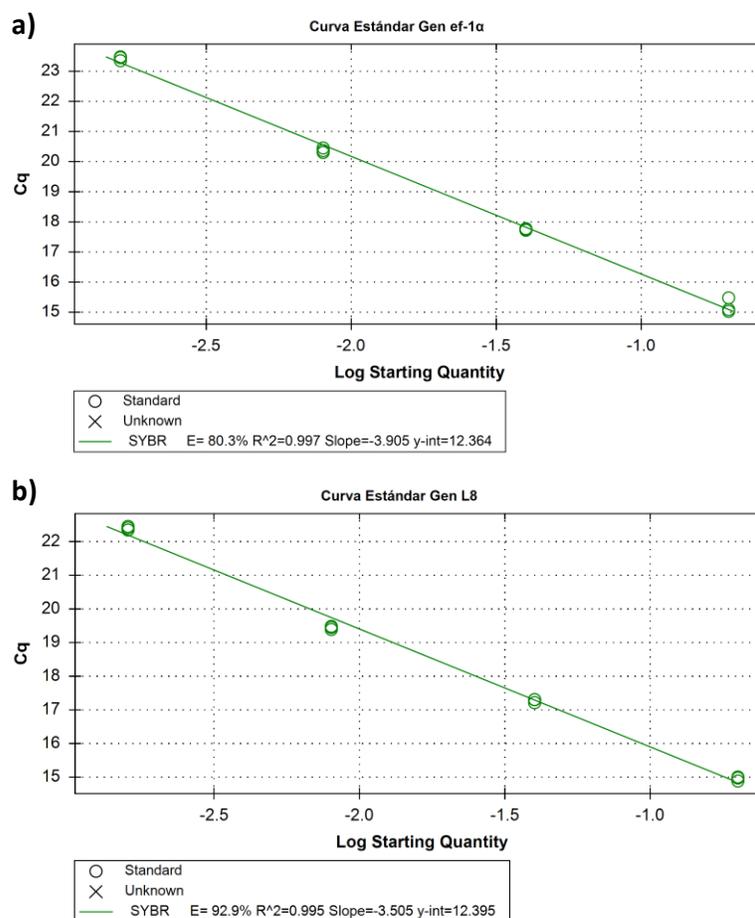


Figura 14. Curvas estándar de los genes de referencia *Ef1 α* (a) y *L8* (b).

Para el gen *gapdh* se obtuvo un 90.6% (1.906) de eficiencia con una $r^2= 0.994$. Los valores de Cq promedio mínimo y máximo fueron de 16.97 y 24.52, respectivamente. En cuanto a la curva de disociación no se obtuvieron productos inespecíficos y el pico de disociación obtenido tuvo una Tm de 87°C (Figura 13d).

Para el gen *β -actina* se obtuvo una eficiencia del 83.9% (1.839) con $r^2= 0.997$ y valores de Cq promedio mínimo y máximo de 14.15 y 22.18, respectivamente. En la curva de disociación se obtuvo un solo pico de disociación con una Tm de 86°C (Figura 13b).

6.7 Validación de los genes de referencia

Se realizó la validación de los genes de referencia *gapdh*, *Ef1 α* , *L8* y *β -actina* con 12 grupos de cDNA de 3 muestras pertenecientes a diferentes condiciones y temperaturas

de aclimatación. También se utilizaron controles positivos para cada gen y mediante la estrategia de optimización de muestras no se requirió de un inter-calibrador por placa.

Se obtuvieron los valores de Cq promedio para cada gen y estos fueron utilizados para el análisis en los programas *Genorm*, *Normfinder* y *Bestkeeper*, además de la herramienta RetFinder. En la tabla 10 se muestran los valores de Cq obtenidos.

Tabla 9. Valores de Cq promedio obtenidos para cada gen de referencia.

Muestra	<i>gapdh</i>	<i>B-actina</i>	<i>L8</i>	<i>Ef1α</i>
20C	17.78	16.00	16.58	18.79
20U	18.73	15.93	16.77	19.11
20B	18.14	16.04	16.17	18.44
20NA	18.13	15.93	16.43	18.35
26C	18.72	16.16	16.73	18.75
26U	19.21	15.55	16.65	18.68
26B	19.51	16.11	16.99	19.12
26NA	19.31	16.21	16.67	18.84
32C	17.31	15.88	16.63	18.17
32U	15.98	15.64	15.99	17.10
32B	18.87	15.88	17.03	18.39
32NA	16.76	16.30	16.06	17.74

En la figura 15 se muestra el intervalo de los valores de la estabilidad (M) de la expresión de los genes de referencia evaluados. En el análisis de *Genorm* indicó que los genes menos estables (valores más cercanos a 1) para las condiciones de este estudio son *β -actina* y *gapdh* con un valor M de 0.617 y 0.801, respectivamente. Mientras que los genes más estables fueron *L8* con valor M de 0.490 y *Ef1 α* con 0.474 ya que estos muestran valores más cercanos a 0.

Genorm también permitió estimar el número óptimo de genes de referencia a utilizar en este estudio mediante el cálculo de la variación pareada (V) entre los genes candidatos. Se obtuvo un valor para V_{2/3} de 0.132 y para V_{3/4} de 0.196, este último valor se encuentra por encima del valor umbral (0.15) por lo cual el uso de 3 genes de referencia se descarta debido a que podría tener un efecto negativo en el factor de normalización y por tanto conducir a conclusiones erróneas sobre la expresión relativa de los genes de interés (Galiveti *et al.*, 2011). Por tanto, *Genorm* indica que se debe utilizar dos genes de referencia para obtener un factor de normalización adecuado para los genes blanco (Figura 16).

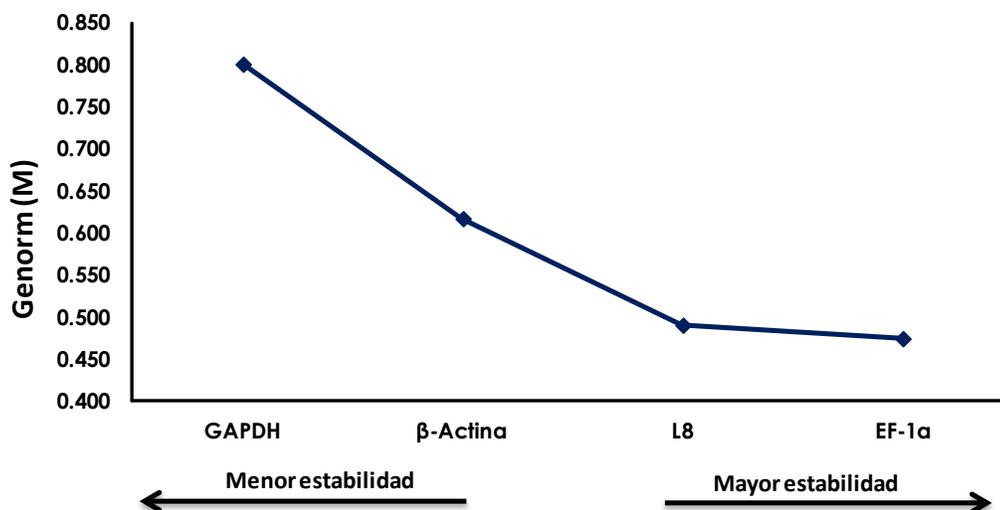


Figura 15. Estabilidad de la expresión (M) de los genes de referencia evaluados con *Genorm*.

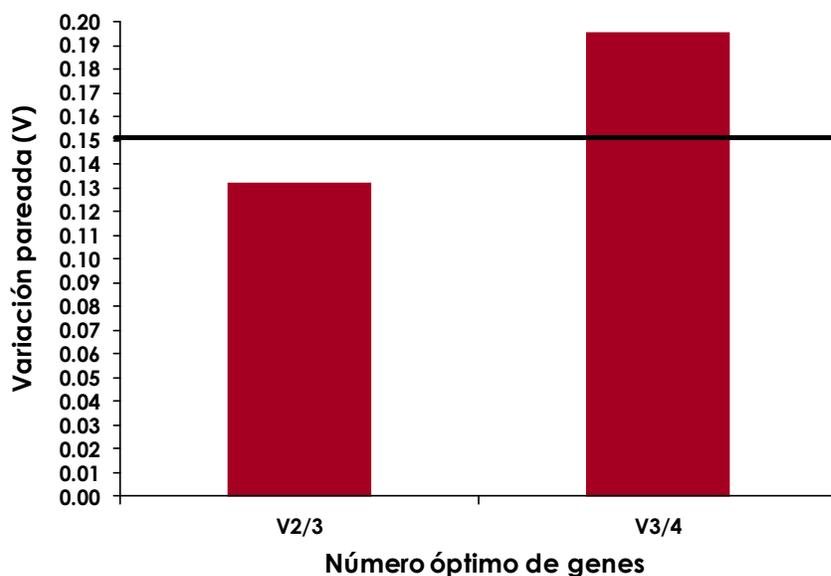


Figura 16. Determinación del número óptimo de genes de referencia para la normalización de los genes blanco obtenido mediante *Genorm*.

En cuanto a la cuantificación relativa de la expresión podemos observar el patrón de variación en todas las muestras con respecto a los diferentes genes y se puede observar que *gapdh* y *β -actina* tienen una variación más marcada aunque no significativa que *L8* y *Ef1 α* (figura 17).

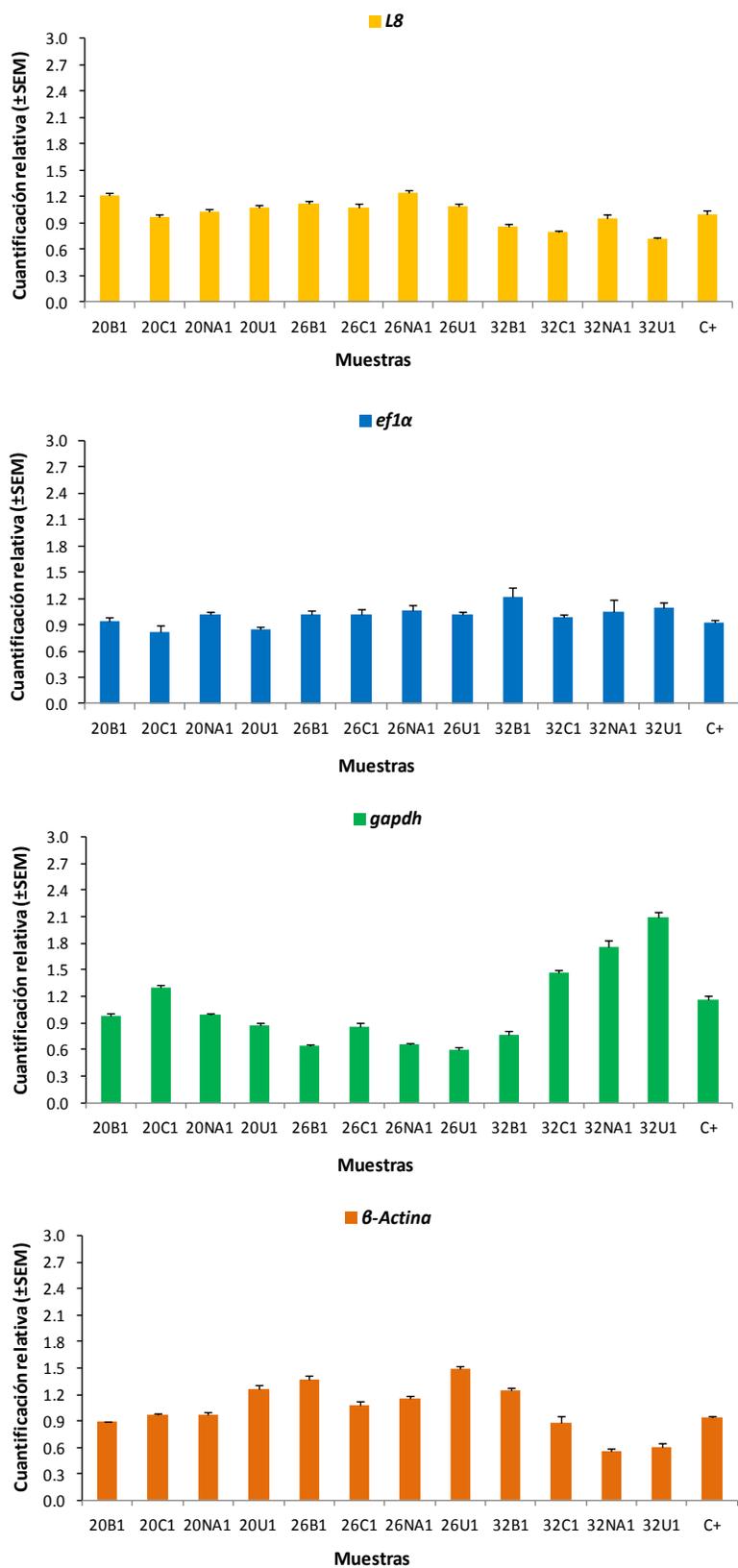


Figura 17. Cuantificación relativa de la expresión de los genes de referencia mediante *Genorm*.

Con *Normfinder* se evaluó el valor de la estabilidad realizando un análisis por tejido (análisis de todos los pools evaluados no importando la condición o temperatura de aclimatación), por condición (evaluación de la estabilidad de la expresión entre organismos ablacionados, no ablacionados y controles de aclimatación independientemente de la temperatura) y por aclimatación (análisis entre grupos de diferentes temperaturas independientemente de la condición). En el análisis realizado por tejido se obtuvo que los genes más estables fueron *L8* y *Ef1α* con valores de 0.003 y 0.004, respectivamente (figura 18a). Para el análisis por condición y aclimatación se obtuvo que los genes más estables fueron *Ef1α* (0.002 y 0.003, respectivamente) y *L8* (0.004 y 0.005, respectivamente) (Figura 18b).

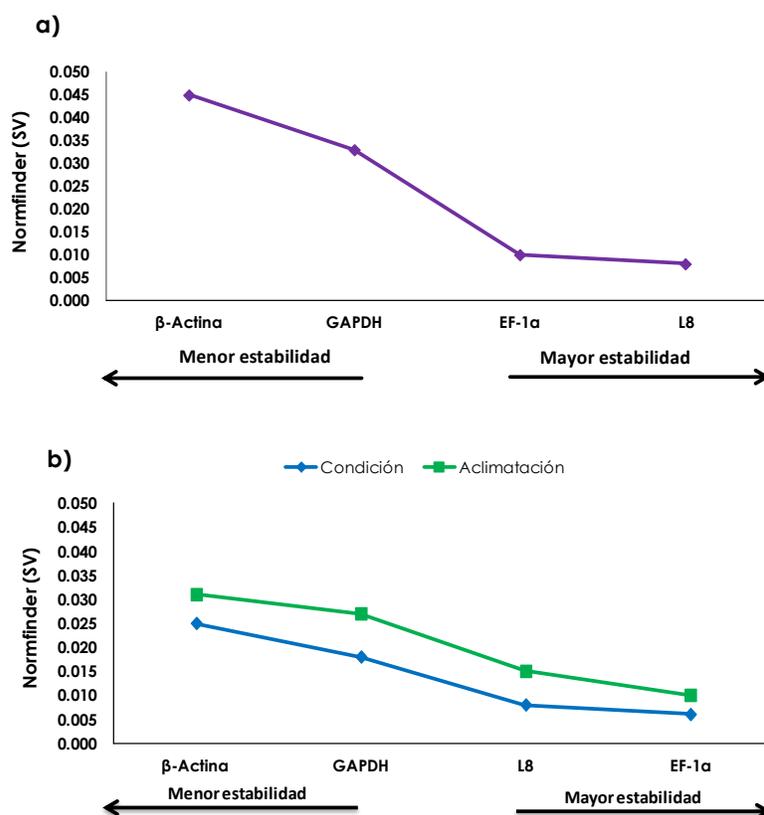


Figura 18. Estabilidad de la expresión obtenida con *Normfinder*. a) Estabilidad evaluada por tejido; b) Estabilidad evaluada por condición y temperatura de aclimatación.

Con el programa *Bestkeeper* se obtuvo que los genes menos estables son *gapdh* y *Ef1α* con 4.69 ± 0.43 y 2.30 ± 0.85 , respectivamente ($CV \pm DS$) e indicó que los genes más estables son β -actina y *L8* (1.04 ± 0.17 y 1.59 ± 0.26 , respectivamente) (figura 19).

Sin embargo, tomando en cuenta tanto los valores del $CV \pm DV$ y el valor de correlación de Pearson los genes más estables son *L8* con $r = 0.852$ así como *Ef1 α* con $r = 0.951$.

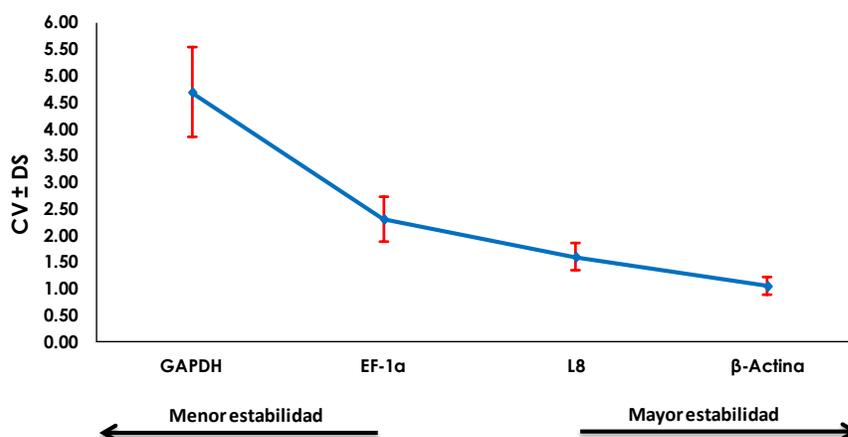


Figura 19. Estabilidad de la expresión de los genes de referencia obtenida mediante *Bestkeeper*.

En la herramienta Retfinder se obtuvo que para *Genorm*, *Normfinder*, Método comparativo Delta Ct y el ranking recomendado los genes de referencia más estables son *L8* y *Ef1 α* , lo cual coincide con lo obtenido con los programas por separado. Para el caso de *Bestkeeper* ésta herramienta indica que *L8* es uno de los genes de referencia más estables. Sin embargo también indica que otro de los genes de referencia más estable es *β -actina*, con lo cual los demás programas no concuerdan y también se puede observar mayor variación en la expresión relativa en comparación con los dos genes más estables (*L8* y *Ef1 α*) (Tabla 10).

Por tanto de acuerdo con los datos obtenidos se utilizarán dos genes de referencia para la normalización de los genes blanco y estos serán *L8* y *Ef1 α* , ya que fueron los más estables para las condiciones experimentales en este estudio.

Tabla 10. Ranking de los genes de referencia obtenido mediante la herramienta RetFinder de Cotton EST Database North Carolina.

Gen	1	2	3	4
Genorm	<i>L8/ef1α</i>		<i>β-Actina</i>	<i>gapdh</i>
Normfinder	<i>L8/ef1α</i>	<i>L8/ef1α</i>	<i>Gapdh</i>	<i>β-Actina</i>
Bestkeeper	<i>β-Actina</i>	<i>L8</i>	<i>Ef1α</i>	<i>gapdh</i>
Delta Ct	<i>Ef1α</i>	<i>L8</i>	<i>β-Actina</i>	<i>gapdh</i>
Ranking recomendado	<i>L8</i>	<i>Ef1α</i>	<i>β-Actina</i>	<i>Gapdh</i>

6.8 Cuantificación de la expresión relativa de los genes *Hif1 α* , *Na⁺/K⁺ ATPasa*, *Hsp70* y *Hsp90* en branquia de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

6.8.1 Expresión relativa del Gen *Hsp70*

6.8.1.1 Organismos controles.

En la figura 20 se muestra la expresión relativa del gen *Hsp70* obtenida para los controles (A) y los controles (TCMáx) y se puede observar que en general la expresión mantiene un nivel similar en ambos grupos con la misma condición (No ablacionados) y no existen diferencias altamente significativas entre las medias con excepción de los controles (A) a 20°C (1.453) que presentan diferencias altamente significativas con respecto a los controles (A) a 26 y 32°C (0.717 y 0.432, respectivamente) así como de los controles (TCMáx) de las tres temperaturas de aclimatación (0.794, 0.552 y 0.704).

6.8.1.2 Organismos experimentales.

En los organismos sometidos a TCMáx, se observa de manera general un aumento en la expresión del transcrito de *Hsp70* en organismos ablacionados unilateral y bilateralmente con respecto a los organismos no ablacionados (controles) en las tres temperaturas de aclimatación (figura 21). Este gen presentó una expresión mayor estadísticamente significativa en organismos ablacionados unilateral y bilateralmente aclimatados a 20°C y en los ablacionados bilateralmente a 32°C. La expresión del gen *Hsp70* entre los organismos ablacionados (1.844 y 1.876, respectivamente) aclimatados a 20°C no difirió. Sin embargo, hubo diferencias significativas en la expresión con respecto a los no ablacionados (0.794). Entre los organismos ablacionados aclimatados a 26°C no hubo diferencias significativas (0.979 y 1.313, respectivamente), sin embargo si presentaron diferencias significativas con respecto a los no ablacionados (0.552). En los organismos aclimatados a 32°C se presentaron diferencias altamente significativas en la expresión de *Hsp70* en las tres condiciones experimentales (1.255, 1.777 y 0.704, respectivamente).

Por otra parte, al comparar entre condiciones se observó que no existen diferencias significativas en la expresión de *Hsp70* en los organismos no ablacionados,

independientemente de la temperatura de aclimatación. La expresión de este transcrito en los organismos ablacionados unilateralmente aclimatados a 26 y 32°C no presentaron diferencias, mientras que los aclimatados a 20°C presentaron diferencias significativas (1.844). En los organismos ablacionados bilateralmente la expresión fue altamente significativa en las aclimataciones de 20 y 32°C (1.876 y 1.777).

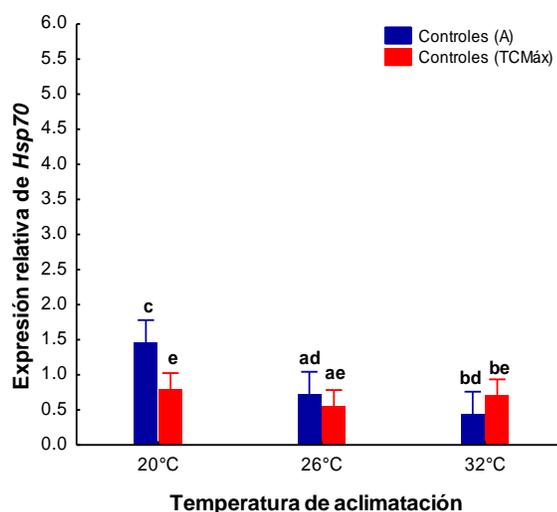


Figura 20. Análisis de varianza de dos vías de la expresión relativa del gen *Hsp70* en controles no ablacionados de aclimatación y sometidos a TCMáx. (Las letras indican la condición versus la aclimatación en las cuales no se encontraron diferencias altamente significativas $p>0.05$). Las líneas con desviaciones denotan los intervalos de confianza (0.95) para cada media.

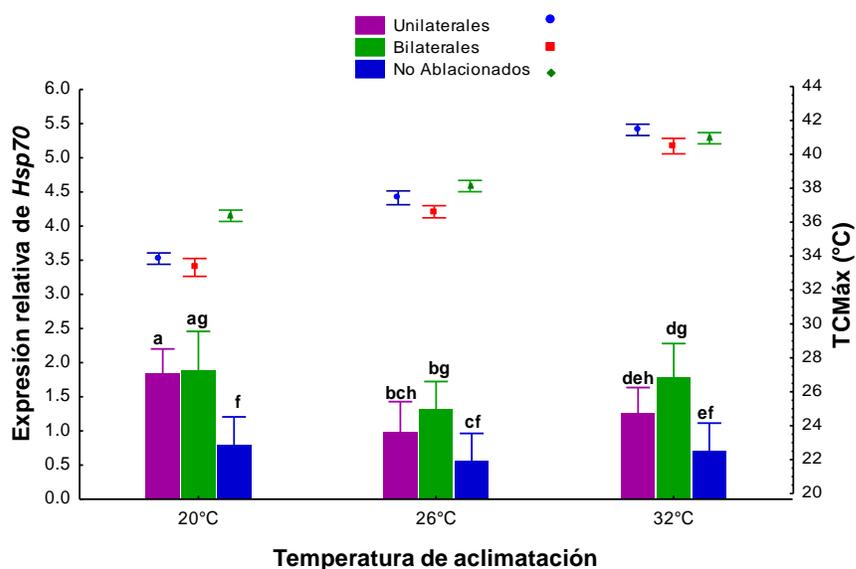


Figura 21. Análisis de varianza de dos vías de la expresión relativa del gen *Hsp70* en organismos sometidos a TCMáx. (Las letras indican la condición versus la aclimatación en las cuales no se encontraron diferencias altamente significativas $p>0.05$). Las líneas con desviaciones denotan los intervalos de confianza (0.95) para cada media y los marcadores (círculo, cuadrado y rombo) con sus respectivos errores estándar muestran las TCMáx correspondientes para cada condición por temperatura de aclimatación.

6.8.2 Expresión relativa del Gen *Hsp90*

6.8.2.1 Organismos controles.

La expresión relativa del *gen Hsp90* en controles (A) y controles (TCMáx) no mostró diferencias significativas en las temperaturas de aclimatación de 20°C y 26°C (0.744, 0.572, 0.530 y 0.707), manteniendo un nivel relativamente bajo. En el caso de los controles (TCMáx) de 32°C (1.345) se observó un incremento significativo en comparación con los controles (A) de la misma temperatura de aclimatación (0.226). También se puede observar que existe una tendencia de incremento en la expresión de los controles (TCMáx) con relación a la temperatura de aclimatación. Sin embargo, se observa que la temperatura de aclimatación aunada al efecto del estrés térmico agudo ejercen un efecto significativo en la expresión de *Hsp90* en organismos no ablacionados (Figura 22).

6.8.2.2. Organismos experimentales

En cuanto al efecto de la temperatura de aclimatación en los organismos sometidos a TCMáx, en la figura 23 se puede observar que la expresión del *gen Hsp90* en general fue mayor en los organismos de la temperatura de aclimatación de 32°C. Esta expresión se mantuvo constante en los organismos aclimatados a 20 y 26°C independientemente de la condición. Los organismos ablacionados unilateral y bilateralmente (2.923 y 3.195) aclimatados a 32°C presentaron diferencias significativas en la expresión de *Hsp90* en comparación con los no ablacionados, incluso entre las diferentes temperaturas de aclimatación.

Por otra parte, al analizar el efecto de la condición se observó que la expresión del transcrito de *Hsp90* entre los organismos unilaterales (1.102 y 1.098), bilaterales (1.114 y 1.290) y no ablacionados (0.571 y 0.708) a 20 y 26°C, respectivamente, no presentaron diferencias significativas. Los organismos no ablacionados de la temperatura de aclimatación de 32°C (1.345) no presentaron diferencias en comparación con los organismos no ablacionados a 26°C (0.708). Sin embargo, la expresión de los organismos unilaterales y bilaterales a 32°C presentó la mayor expresión dentro de los grupos.

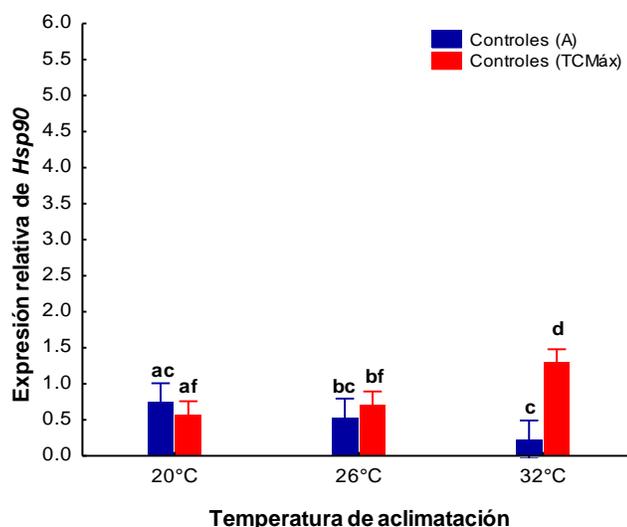


Figura 22. Análisis de varianza de dos vías de la expresión relativa del gen *Hsp90* en controles no ablacionados de aclimatación y sometidos a TCMáx. (Las letras indican la condición versus la aclimatación en las cuales no se encontraron diferencias altamente significativas $p > 0.05$). Las líneas con desviaciones denotan los intervalos de confianza (0.95) para cada media.

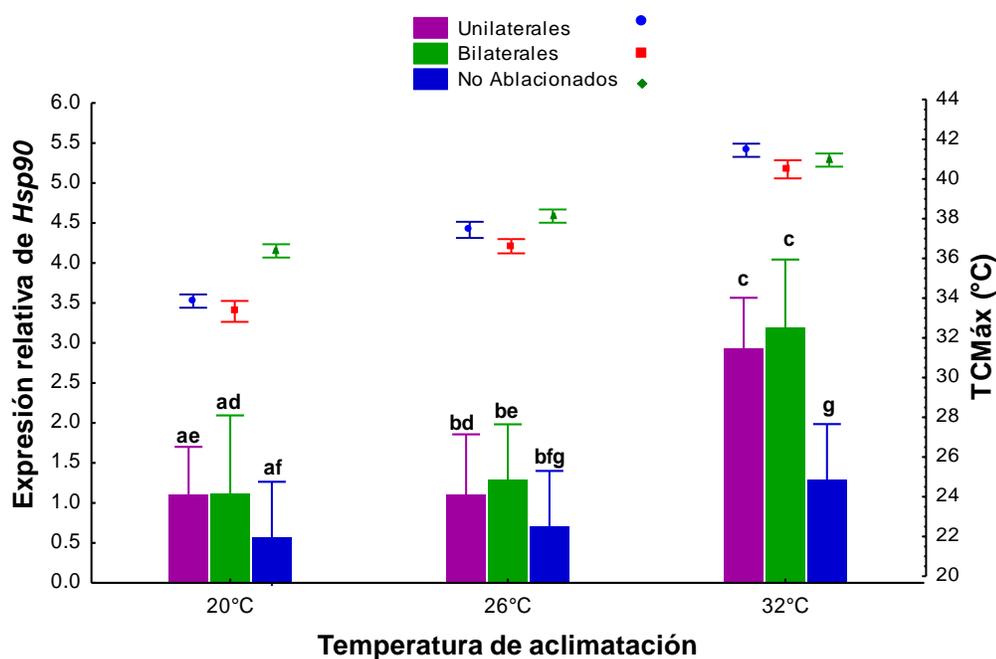


Figura 23. Análisis de varianza de dos vías de la expresión relativa del gen *Hsp90* en organismos sometidos a TCMáx. (Las letras indican la condición versus la aclimatación en las cuales no se encontraron diferencias altamente significativas $p > 0.05$). Las líneas con desviaciones denotan los intervalos de confianza (0.95) para cada media y los marcadores (círculo, cuadrado y rombo) con sus respectivos errores estándar muestran las TCMáx correspondientes para cada condición por temperatura de aclimatación.

6.8.3 Expresión relativa del Gen *Hif1 α*

6.8.3.1 Organismos controles

En los controles (A) y controles (TCMáx) no se encontraron diferencias altamente significativas en la expresión del transcrito *Hif1 α* en las temperaturas de aclimatación de 20°C (1.429 y 1.064) y 32°C (1.050 y 0.770). Tampoco se encontraron diferencias en la expresión en los controles (TCMáx) independientemente de la temperatura de aclimatación. Se presentaron diferencias en la expresión en los controles (A) y controles (TCMáx) a 26°C (2.164 y 0.759). También se presentaron diferencias entre los controles (A) a 26 y 32°C (Figura 24).

6.8.3.2 Organismos experimentales

En los organismos sometidos a TCMáx, se observa la expresión relativa del gen *Hif1 α* , el cual mostró en general un aumento en la expresión del mismo (figura 25). En los organismos previamente aclimatados a 20°C no se encontraron diferencias en la expresión de este transcrito entre las diversas condiciones. En los organismos aclimatados a 26°C se observaron diferencias significativas entre los organismos ablacionados unilateral (1.978) y bilateralmente (1.756) con respecto a los organismos no ablacionados (0.759). Por otra parte, los organismos ablacionados unilateralmente aclimatados a 32°C (1.963) presentaron diferencias significativas en comparación con los organismos ablacionados unilateralmente (0.833) y los no ablacionados (0.770).

En cuanto a las condiciones de los organismos se observó que los organismos no ablacionados no presentaron diferencias en la expresión de *Hif1 α* independientemente de la temperatura de aclimatación. Los organismos ablacionados unilateralmente presentaron diferencias significativas en los niveles de expresión de este transcrito únicamente en la temperatura de aclimatación de 32°C (1.963). Mientras que los organismos ablacionados bilateralmente no presentaron diferencias significativas en los valores de expresión de *Hif1 α* entre las diferentes temperaturas de aclimatación. En general no se presentaron diferencias entre las condiciones de los organismos unilaterales con respecto a los unilaterales y no ablacionados en cada una de las

aclimataciones, con excepción de los organismos ablacionados aclimatados a 26°C y los ablacionados bilateralmente aclimatados a 32°C.

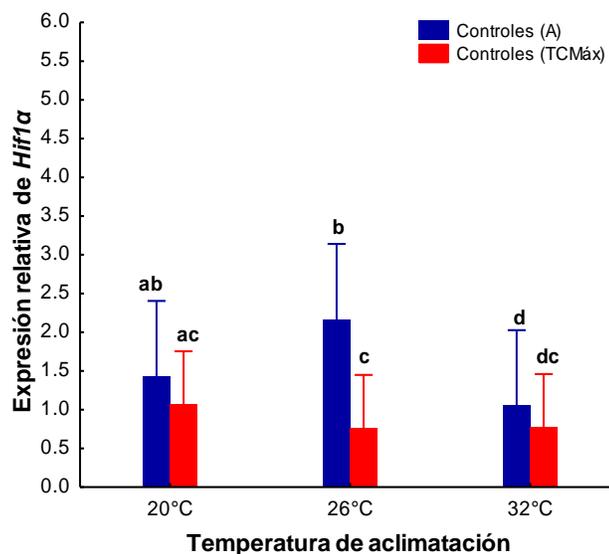


Figura 24. Análisis de varianza de dos vías de la expresión relativa del gen *Hif1α* en controles no ablacionados de aclimatación y sometidos a TCMáx. (Las letras indican la condición versus la aclimatación en las cuales no se encontraron diferencias altamente significativas $p>0.05$). Las líneas con desviaciones denotan los intervalos de confianza (0.95) para cada media.

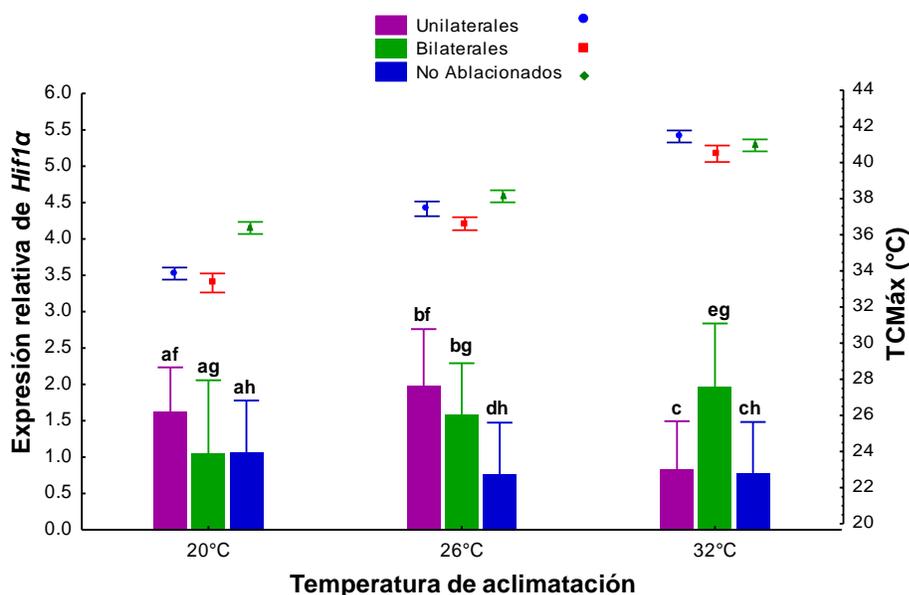


Figura 25. Análisis de varianza de dos vías de la expresión relativa del gen *Hif1α* en organismos sometidos a TCMáx. (Las letras indican la condición versus la aclimatación en las cuales no se encontraron diferencias altamente significativas $p>0.05$). Las líneas con desviaciones denotan los intervalos de confianza (0.95) para cada media y los marcadores (círculo, cuadrado y rombo) con sus respectivos errores estándar muestran las TCMáx correspondientes para cada condición por temperatura de aclimatación.

6.8.4 Expresión relativa del Gen Na^+/K^+ *ATPasa*

6.8.4.1. Organismos controles

En la figura 26 se puede observar los niveles de expresión del transcrito de Na^+/K^+ *ATPasa* en los controles (A) y controles (TCMáx), en los cuales no se encontraron diferencias significativas en la expresión bajo condiciones normales y de estrés térmico agudo inducido, independientemente de la aclimatación a 20°C (1.063y 0.795), 26°C (1.342 y 0.776) y 32°C (0.666 y 0.662).

6.8.4.2 Organismos experimentales

En general, se observó un aumento en la expresión del transcrito de Na^+/K^+ *ATPasa*, aunque en algunas de las temperaturas esta expresión no mostró diferencias significativas entre las diferentes condiciones. En los organismos aclimatados a 20°C los ablacionados unilateral y bilateralmente (1.785 y 1.433) presentaron diferencias significativas con respecto a los no ablacionados (0.795). En los organismos aclimatados a 26°C no se encontraron diferencias en la expresión de Na^+/K^+ *ATPasa* entre los organismos no ablacionados (0.776) y ablacionados unilateral (1.173) y bilateralmente (1.218). En los organismos aclimatados a 32°C los organismos ablacionados unilateralmente (1.600) presentaron diferencias significativas en la expresión de este transcrito con respecto a los no ablacionados (0.663) y a los ablacionados unilateralmente (0.869) (Figura 27).

Con respecto a la condición de los organismos no se presentaron diferencias significativas en la expresión de Na^+/K^+ *ATPasa* de los organismos ablacionados bilateralmente y no ablacionados independientemente de la temperatura de aclimatación. Sin embargo los organismos ablacionados unilateralmente (1.785) de la temperatura de 20°C sí presentó diferencias en la expresión de este transcrito con respecto a los organismos aclimatados a 26 y 32°C (1.173 y 0.869) (Figura 27).

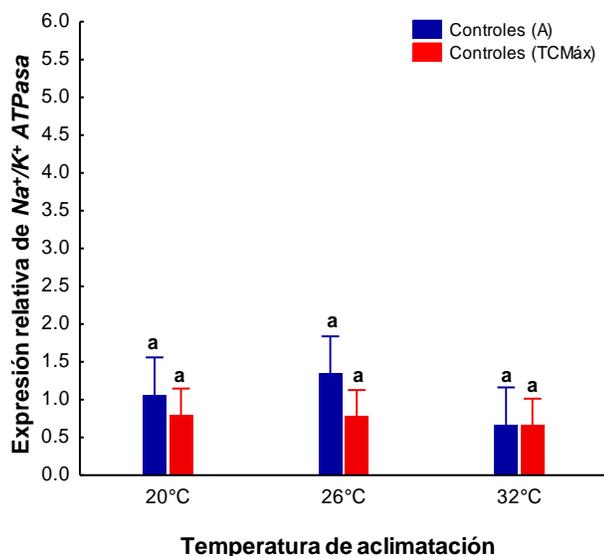


Figura 26. Análisis de varianza de dos vías de la expresión relativa del gen Na^+/K^+ ATPasa en controles no ablacionados de aclimatación y sometidos a TCMáx. (Las letras indican la condición versus la aclimatación en las cuales no se encontraron diferencias altamente significativas $p > 0.05$). Las líneas con desviaciones denotan los intervalos de confianza (0.95) para cada media.

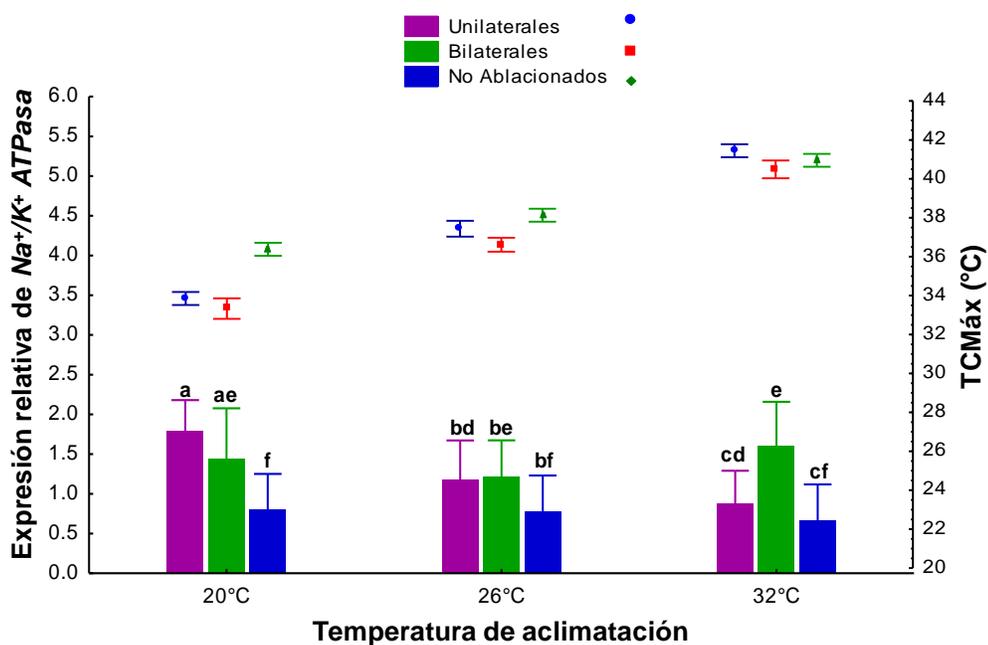


Figura 27. Análisis de varianza de dos vías de la expresión relativa del gen Na^+/K^+ ATPasa en organismos sometidos a TCMáx. (Las letras indican la condición versus la aclimatación en las cuales no se encontraron diferencias altamente significativas $p > 0.05$). Las líneas con desviaciones denotan los intervalos de confianza (0.95) para cada media y los marcadores (círculo, cuadrado y rombo) con sus respectivos errores estándar muestran las TCMáx correspondientes para cada condición por temperatura de aclimatación.

Capítulo 7. Discusión

7.1 Validación de los genes de referencia para el análisis en muestras de branquia de organismos con diferentes condiciones y temperaturas de aclimatación

El gen control interno ideal es universalmente válido, con un nivel de expresión constante a través de todos los tejidos, células, tratamientos y diseños experimentales (Andersen *et al.*, 2004). Sin embargo, Vandesompele *et al.*, (2002) encontraron que no existe un gen de referencia ideal y que los genes de referencia pueden variar considerablemente dependiendo tanto de las condiciones experimentales, como del organismo de estudio. Por lo cual en este trabajo se llevó a cabo una validación de cinco genes de referencia (*18S*, *β -actina*, *Ef1 α* , *gapdh* y *L8*) que han sido reportados en estudios de expresión relativa de genes tanto de camarón como de otras especies.

En camarón existen sólo cuatro estudios dirigidos a la validación de genes de referencia mediante PCR cuantitativo en tiempo real (Dhar *et al.*, 2009; Dhar *et al.*, 2002; Leelatanawit *et al.*, 2012; Sellars *et al.*, 2007). En el primero, Dhar *et al.*, (2002) realizaron un estudio donde se comparó la expresión de los genes *β -actina* y *Ef1 α* para cuantificar la concentración de los RNA virus del síndrome de Taura (TSV) y de la cabeza amarilla (YHV) en *Penaeus sp.* La expresión de *Ef1 α* fue más consistente que la de *β -actina* en el tejido de músculo de la cola de camarón y se concluyó que *Ef1 α* es un mejor control interno para evaluar la concentración de estos virus en tejido de músculo.

En otro estudio, Sellars *et al.*, (2007) examinaron la eficacia de utilizar el gen *18S rRNA* y *β -actina* como genes de referencia para medir la expresión de genes blanco en un grupo diverso de muestras de camarón de Kuruma, las cuales contenían mRNA de diferentes estadios y tejidos (embriones, larvas, post-larvas y gónada). En este caso los autores utilizaron el método de cuantificación absoluta debido a que ésta cuantificación fue superior a la cuantificación relativa cuando se compararon los niveles de transcrito a través de los tejidos de diferentes etapas de desarrollo.

Dhar *et al.*, (2009) examinó la estabilidad de la expresión de cuatro genes de referencia (*β -actina*, *gapdh*, *Ef1 α* y *18S rRNA*) para evaluar la expresión de mRNA del gen de la

proteína de unión a lipopolisacárido y glucano (LGBP) en camarones *Penaeus stilyrostris* sanos e infectados con el virus de la mancha blanca (WSSV). Los datos que obtuvieron en este estudio mostraron que la elección de un gen de control interno o de referencia, afecta dramáticamente los niveles de expresión de LGBP. Por lo tanto es crítico evaluar la expresión del gen de referencia antes de utilizarlo en la normalización de la expresión de los genes blanco. Utilizando un análisis de regresión lineal encontraron que *gapdh* fue el gen de referencia más estable seguido de los genes *Ef1 α* , *18S rRNA* y *β -actina* para sus condiciones experimentales en tejido de músculo. Estos autores utilizaron los programas *Genorm* y *Normfinder* para evaluar la estabilidad de los genes de referencia.

El estudio más reciente, es el de Leelatanawit *et al.*, (2012) en el cual realizaron una evaluación sistemática de la estabilidad de cuatro genes de referencia (*18S rRNA*, *gapdh*, *β -actina* y *Ef1 α*) en muestras de ovario y testículo de organismos de *Penaeus monodon* silvestres, cultivados y ablacionados. La cuantificación se realizó en PCR tiempo real y se utilizaron las herramientas *Genorm* y *Normfinder* para evaluar la estabilidad de los genes de referencia. Los genes más estables en el tejido de testículo de acuerdo con *Normfinder* fueron *Ef1 α* y *gapdh*, en primero y segundo lugar, respectivamente, mientras que para el tejido de ovario se obtuvo que *gapdh* y *Ef1 α* fueron los genes más estables en los organismos silvestres y cultivados. Para *Genorm* los genes *Ef1 α* y *gapdh* fueron los que tuvieron la mayor estabilidad tanto en ovario como testículo en organismos cultivados, mientras que *Ef1 α* y *β -actina* fueron los más estables en tejido de ovario de hembras ablacionadas y de vida silvestre. Con base en los resultados obtenidos realizaron la cuantificación de la expresión de los genes *Dmc1* y *vitelogenina*. También sugieren que *Ef1 α* es el más versátil como gen de referencia en análisis de qPCR para el sistema reproductivo de camarones de *Penaeus monodon*.

Existen algunos trabajos relativamente recientes que han enfatizado la necesidad de validar genes de referencia que permitan evaluar la expresión relativa de genes para cada condición experimental, antes de ser utilizados en la normalización de la expresión relativa de los genes blanco (Andersen *et al.*, 2004; Gutierrez *et al.*, 2008). Para el caso de este trabajo de tesis no existen trabajos previos en donde se realice la validación de los genes de referencia en organismos de *Litopenaeus vannamei* aclimatados a

diferentes temperaturas con diferentes condiciones y sometidos a estrés térmico agudo (TCMáx) en tejido de branquia. Por lo tanto, con el fin de conocer la estabilidad de diferentes genes de referencia para las condiciones experimentales de este estudio se utilizaron tres programas bioinformáticos diseñados para este fin tales como *Genorm*, *Normfinder* y *Bestkeeper*, además se realizó una evaluación en la herramienta RetFinder de Cotton EST Database North Carolina.

En el presente trabajo, al evaluar la estabilidad de los cuatro genes de referencia seleccionados (*β -actina*, *Ef1 α* , *gapdh*, *L8*) utilizando el programa *Genorm*, se encontró que los genes más estables fueron *L8* y *Ef1 α* , seguidos por el gen *β -actina*. De acuerdo con *Normfinder* al realizar el análisis por grupos, para el caso de tejido se encontró que los genes más estables también fueron *L8* y *Ef1 α* , lo cual coincide con lo obtenido para *Genorm*. En el caso del análisis de los grupos realizados para aclimatación y condición se invirtieron los lugares mostrando como más estable a *Ef1 α* y *L8* en primero y segundo lugar, respectivamente. En la herramienta *Bestkeeper* se obtuvo que los genes más estables fueron *L8* y *Ef1 α* , tomando en cuenta tanto el $CV \pm DS$ como la correlación de Pearson (r^2). Es importante que la correlación de Pearson sea alta, siempre y cuando esta correlación no sea una consecuencia de una co-regulación entre genes (Galiveti *et al.*, 2011).

Aursnes *et al.*, (2011) menciona que deben seleccionarse genes pertenecientes a diferentes rutas metabólicas para minimizar los posibles efectos de una co-regulación de genes, ya que *Genorm* tiende a asignar un buen resultado a genes co-regulados de una misma ruta debido a que utiliza un enfoque de comparación pareada. En el presente estudio, los dos genes de referencia obtenidos como los más estables por *Genorm* muestran diferentes funciones celulares y se encuentran involucrados en diferentes procesos metabólicos, reduciendo con ello un posible efecto de co-regulación. Por esta razón la interpretación de los resultados obtenidos con estos programas para evaluar la estabilidad de los genes de referencia debe ser realizada cautelosamente tomando en cuenta qué es lo que evalúa cada uno de los algoritmos.

De acuerdo con los resultados obtenidos mediante los tres programas *Genorm*, *Normfinder* y *Bestkeeper* se seleccionaron a los genes *L8* y *Ef1 α* , ya que de acuerdo

con *Genorm* presentan un patrón de expresión relativa muy similar. Además, *Normfinder* indicó que existe una variación reducida en la expresión de estos mismos genes al ser evaluados inter e intra grupalmente. Cabe destacar que *Ef1 α* es un gen que ha sido reportado y validado como gen de referencia en estudios del sistema inmune de *Penaeus* sp. y sistema reproductivo de *Penaeus monodon* en tejido de músculo (Dhar *et al.*, 2002; Leelatanawit *et al.*, 2012), demostrando con ello que es un gen versátil por lo menos en las tres condiciones en las que se ha evaluado (a nivel de sistema inmune, sistema reproductivo y en este caso, estrés térmico agudo). En cuanto a *Bestkeeper*, también hubo coincidencia en cuanto a que *L8* y *Ef1 α* fueron los más estables presentando un bajo CV con una DS menor a 1, ya que de acuerdo con Figueiredo *et al.*, (2013) los genes de referencia con un valor de DS mayor a 1 deben considerarse como inconsistentes y deben ser excluidos, por lo tanto los genes con menor valor SD deben ser considerados como los más estables. También debe tomarse en cuenta el valor de la correlación de Pearson para elegir el gen o genes de referencia más estables en las condiciones experimentales ensayadas. Axtner y Sommer (2009) mencionan que es difícil obtener una DS calculada por *Bestkeeper* menor a 1 ya que por lo general las muestras de biopsias de tejido están conformadas por diferentes tipos de células y muestran una alta variación. Sin embargo, en este estudio las DS obtenidas para cada uno de los genes de referencia fueron menores a 1, lo cual indica que las células en efecto provienen de un solo tipo de tejido, en este caso de branquia.

El análisis realizado con *Genorm* tiene como ventaja que además estima un factor de normalización (NF) utilizando la media geométrica de los mejores genes de referencia, utilizando la variación pareada con un valor de 0.15 como umbral. Es decir, permite estimar el número óptimo de genes de referencia para normalizar la expresión de los genes blanco. *Genorm* indicó a través del estimador V que la introducción de dos genes es adecuado para normalizar a los genes blanco de este estudio, ya que presentan un valor menor a 0.15 como lo recomienda Vandesompele *et al.*, (2002). Basados en este parámetro se tomaron dos genes de referencia (*L8* y *Ef1 α*) para la normalización de los genes blanco, lo cual según Figueiredo *et al.*, 2013 se debe normalizar con al menos dos controles internos o genes de referencia.

El gen 18S rRNA fue excluido como gen de referencia para su validación debido a que desde un inicio presentó una variación muy amplia en cuanto a la cantidad de transcrito inicial, con la necesidad de realizar una dilución 1:200 para poder obtener valores de Cq parecidos a los demás genes de referencia seleccionados, por lo que al incluirlo en la validación ya de antemano se esperaba que presentara diferencias significativas, debido a que existía una variación superior en comparación con los demás genes de referencia. Este gen es ampliamente utilizado en la mayoría de los estudios para realizar análisis de cuantificación relativa de la expresión, sin embargo para este estudio presentó una gran diferencia en los valores de Cq en comparación con los demás genes de referencia y blanco, por lo que para las condiciones experimentales ensayadas en este trabajo no es un buen gen de referencia. Esto concuerda con lo reportado por Vandesompele *et al.*, 2002 en cuanto a que no existen genes de referencia ideales y que, dependiendo del tipo de célula, tejido y condiciones experimentales, la expresión génica de un gen control o de referencia puede variar.

7.2 Expresión relativa de los genes *Hsp70* y *Hsp90* en branquia de camarón blanco *L. vannamei*

En el ambiente acuático, la mayoría de los organismos se encuentran expuestos a diferentes factores ambientales tales como la temperatura, salinidad, contaminantes y oxígeno, entre otros, que varían ampliamente dependiendo de la temporada, clima o actividades antropogénicas; y en consecuencia pueden desencadenar en los organismos una serie de alteraciones bioquímicas, fisiológicas e histológicas. Por lo tanto, los organismos vertebrados e invertebrados acuáticos han desarrollado un mecanismo de protección como respuesta ante condiciones de estrés térmico basado en la inducción de proteínas chaperonas (proteínas de choque térmico-HSPs) (Luan *et al.*, 2010; Qian *et al.*, 2012; Zhenyu *et al.*, 2004). La participación de los genes de HSPs en la respuesta a choque térmico ha sido documentada en algunas especies como *Penaeus monodon* (Lo *et al.*, 2004), *Fenneropenaeus chinensis* (Luan *et al.*, 2009; Zhenyu *et al.*, 2004; Luan *et al.*, 2010), *Crangon crangon*, *Palaemon elegans*, *Palaemon longirostris* (Madeira *et al.*, 2012) y *Macrobrachium rosenbergii* (Liu *et al.*, 2004).

En este estudio se encontró que los niveles de expresión de *Hsp70* en los controles (A) y en los controles (TCMáx) no presentaron diferencias en la expresión manteniendo niveles muy similares, como lo reportado por Madeira *et al.*, (2012) en donde encontró que algunas especies intermareales como *C. maenas* y *P. elegans* pueden mantener ciertos niveles de expresión de *Hsp70*, lo cual debe ser suficiente para procesar proteínas dañadas y evitar un exceso en la producción de HSPs y sus efectos deletéreos. Gusmão (2011) menciona que las HSPs pueden expresarse de acuerdo con la temperatura de ocurrencia y los requerimientos celulares, dependiendo de la cantidad de proteínas desnaturalizadas o inestables y que esto puede ser un mecanismo de adaptación para prevenir un costo energético y sobreexpresión excesivas, coincidiendo con Madeira *et al.*, (2012) en que altas cantidades de estas proteínas pueden ser tóxicas para las células.

También Zhenyu *et al.*, (2004) mencionan que bajo, condiciones normales la expresión de *Hsp70* juega un rol importante en la biogénesis de proteínas. Lo anterior tiene un significado potencial en los organismos durante el crecimiento, cuando se requiere de una gran cantidad de *Hsp70* para potenciar la síntesis de proteínas. Esto se pudo observar en los controles (A) de este estudio bajo las diferentes temperaturas, en donde a pesar de que no se encontraron diferencias significativas, sí se observó un patrón de decremento conforme aumenta la temperatura de aclimatación.

Re *et al.*, (2005) encontró que existe un efecto directo de la temperatura de aclimatación sobre la temperatura crítica máxima. Sin embargo, al evaluar la expresión de *Hsp70* en organismos no ablacionados, no se encontró un efecto directo de la temperatura, ni incluso al ser sometidos a experimento de TCMáx. Los niveles de expresión se mantuvieron similares a los controles de aclimatación.

Al evaluar el efecto de la ablación sobre la expresión de *Hsp70* en organismos sometidos a TCMáx se observó que los tres grupos presentaron expresión inmediata de este transcrito a diferentes niveles ya que *Hsp70* no presenta intrones. Lo cual es una característica que permite que la respuesta al estrés térmico sea muy rápida debido a que no se lleva a cabo splicing alternativo, y la proteína no sufre cambios post-traduccionales (Madeira, 2012). Algunos autores como Rungrassamee *et al.*, (2010)

encontraron que los niveles de expresión de *Hsp70* en hepatopáncreas de *P. monodon* fueron significativamente inducidos dentro de la primera hora de la exposición térmica. Otro caso documentado es el del camarón chino *F. chinensis*, en el que *Hsp70* fue dramáticamente inducida bajo choque térmico mientras que *Hsc70* fue ligeramente afectada (Li *et al.*, 2009; Luan *et al.*, 2009). En años recientes Qian *et al.*, (2012) encontró que los genes *Hsp70*, *Hsp90*, *Hsc70* y *Hsp60* mostraron una aparente sobre regulación aunque bajo diferentes patrones de expresión. La máxima expresión de *Hsp70* se observó 1 h después de la exposición a 36°C en *L. vannamei* siendo 9.5 veces mayor que la del control, y su expresión declinó rápidamente cuando los organismos fueron regresados a su temperatura de aclimatación, obteniendo un nivel de expresión igual al del grupo control. Sus datos revelaron que el nivel de transcripción de *Hsp70* fue el más sensible a las fluctuaciones de temperatura dentro de los cuatro genes evaluados, lo cual se pudo observar también en este estudio.

Se observó que existe un impacto en la expresión de *Hsp70* en los organismos ablacionados unilateral y bilateralmente en las temperaturas de aclimatación de 20 y 32°C, así como en los bilaterales de 26°C. Lo anterior debido probablemente al desbalance en los diferentes procesos metabólicos por la falta del complejo órgano X-Glándula del seno localizado en los pedúnculos oculares. Este es principal órgano neuroendocrino en crustáceos, en el que se sintetizan, almacenan y secretan hormonas hacia la hemolinfa para regular los diversos procesos metabólicos. Dentro de los más estudiados se encuentran la vitelogénesis, la ingesta de alimento, la digestión, transporte de nutrientes, la muda, metabolismo de lípidos, regulación de glucosa y lípidos en la hemolinfa, y el balance hidromineral, entre otras (Sainz-Hernández *et al.*, 2008). Por lo tanto, el efecto de la ablación no sólo tiene consecuencias a nivel metabólico, inmunológico, reproductivo, entre otros, sino también indirectamente a nivel molecular en la expresión del gen *Hsp70* involucrado en el mantenimiento celular de los organismos cuando se encuentran frente a un estrés causado por el incremento de la temperatura.

En este estudio se pudo comprobar que en efecto el gen *Hsp70* presenta una rápida expresión ante condiciones de estrés térmico independientemente de la condición o aclimatación de los organismos. Por lo que se coincide con Qian *et al.*, (2012) en que

este gen juega un papel dominante en la protección de las células ante el daño causado por estrés térmico agudo; y puede ser un gen candidato para ser utilizado como biomarcador para evaluar estrés térmico en el cultivo de camarón blanco e incluso en su ambiente natural. Además puede ser un indicador del desbalance metabólico y la reducción en la tolerancia térmica causados por la ablación unilateral y bilateral en el camarón blanco ante condiciones de estrés térmico agudo.

Cabe destacar que esta tesis es un primer reporte sobre la expresión diferencial del gen *Hsp70* en branquia de *L. vannamei* en respuesta a TCMáx, obteniendo niveles altos de expresión en organismos ablacionados unilateral y bilateralmente en comparación con los no ablacionados. Además se encontró que la aclimatación no tiene un efecto sobre la expresión relativa de este gen en controles de aclimatación y controles de TCMáx. Esto evidencia el hecho de que, bajo condiciones de choque térmico, las células inician la respuesta mediante la regulación de la expresión de las HSPs, incluyendo *Hsp70* con el objetivo de sobrevivir al estrés (Luan *et al.*, 2010). Además, esta proteína induce la expresión de este gen en un corto periodo de tiempo al incrementarse la temperatura, puesto que es muy sensible a variaciones térmicas. Por lo tanto, juega un rol más crucial que la *Hsc70* en la protección ante daño celular. Esta rápida reacción de *Hsp70* debe proteger al camarón del estrés agudo durante el cual deben actuar como chaperonas para un gran número de proteínas desnaturalizadas en la célula y reducir a su vez la sobrecarga de proteínas mal plegadas durante el proceso (Luan *et al.*, 2010).

Para el caso de la *Hsp90* en los controles (A) y controles (TCMáx) aclimatados a 20 y 26°C, así como los controles (A) a 32°C se presentó inducción del gen aunque a niveles bajos. Los valores obtenidos fueron muy similares a los reportados por Qian *et al.*, (2012) que encontraron que la expresión de este gen se mantiene a bajos niveles en hepatopáncreas de *L. vannamei* aclimatados a 27±1°C. También coincide con lo reportado por Rugrassamee *et al.*, 2010 quienes reportan niveles de expresión bajos en branquia de organismos aclimatados a 27±2°C y que no son sometidos a choque térmico, mientras que en organismos sometidos a choque térmico aclimatados a 35°C encontraron inducción del gen a partir de la primer hora de exposición y esta expresión se mantuvo estable hasta las 2.5 horas. En el caso de los controles (TCMáx) aclimatados a 32°C se pudo observar que la expresión de *Hsp90* incrementa

significativamente en comparación con los controles (A) al ser sometidos a TCM_{máx}. El patrón de expresión encontrado coincide con lo reportado por Qian *et al.*, (2012) en donde al someter a *L. vannamei* ante un estrés térmico a 36°C midiendo cada cierto lapso de tiempo se incrementa significativamente la expresión del gen, y se reducen durante la fase de recuperación aunque manteniendo niveles de expresión por encima de los controles.

Se encontró que la temperatura crítica máxima en organismos aclimatados a 32°C ejerce un efecto significativo sobre la expresión del gen de *Hsp90* y al adicionar el efecto de la ablación sobre la respuesta del organismo al choque térmico, ésta expresión se ve sobre regulada a niveles más altos. Lo anterior es debido quizá a que en esas temperaturas críticas máximas comienza a haber un desequilibrio homeostático de la célula por la cantidad de proteínas desnaturalizadas y la afectación de los procesos en los cuales se encuentra involucrado el gen *Hsp90* como son: las rutas de traducción de señales, los factores transcripcionales, regulación del ciclo celular y los receptores esteroides hormonales (Rugrassamee *et al.*, 2010). Por lo cual, organismos y aclimatados a temperaturas superiores inducen una expresión significativamente alta al ser sometidos a choque térmico agudo, en comparación con la expresión de organismos ablacionados aclimatados a menor temperatura, en los cuales hay una tendencia a mantener niveles bajos y estables de expresión.

Bajo condiciones normales de aclimatación, las dos HSPs presentaron expresión en el tejido de branquia. Este tejido que se encuentra en contacto directo y constante con los cambios ambientales, por lo que puede detectar cambios en el ambiente, tales como el cambio de la temperatura, más rápido que algunos otros tejidos como el hepatopáncreas. Esto sugiere también que estas dos proteínas son requeridas para mantener la homeostasis celular ante condiciones de estrés térmico (Rugrassamee *et al.*, 2010).

7.3 Expresión relativa de *Hif1α*.

Algunos invertebrados marinos poseen la habilidad de adaptarse a concentraciones variables de oxígeno, debido a que los mecanismos de detección y respuesta hipóxicas pudieron haberse establecido durante su historia evolutiva. La hipoxia subletal puede

desencadenar una serie de respuestas a nivel comportamiento, fisiológico, bioquímico y molecular en organismos marinos que puede reducir drásticamente su estado físico general (Cai *et al.*, 2014).

En años recientes, el cambio climático global, particularmente el incremento en la temperatura ya ha tenido efectos observables en los ambientes naturales. Para los ecosistemas marinos, el incremento en la temperatura del agua es la causa probable de algunas consecuencias negativas como los florecimientos algales (blooms) y la reducción de la solubilidad del oxígeno. En particular la hipoxia causada por el aumento en la temperatura incrementa la tasa metabólica y la tasa respiratoria del cuerpo, resultando en una alta mortalidad de organismos benthicos marinos. Por lo tanto la hipoxia se encuentra estrechamente relacionada con la alta temperatura, el cual es un factor que controla el grado de hipoxia (Cai *et al.*, 2014)

Los factores inducibles de hipoxia (HIFs) son una familia de factores de transcripción que se encuentran altamente conservadas, los cuales actúan como los principales reguladores de la homeostasis oxigénica y la respuesta adaptativa a hipoxia (Cai *et al.*, 2014).

En este estudio la expresión relativa del gen *Hif1α* mostró una mayor expresión significativa en los controles de aclimatación en comparación con los controles sometidos a TCM_{max} aclimatados a 26°C. Esto coincide con lo reportado por Soñanez-Organis (2009) quienes encontraron que bajo condiciones de normoxia en tejido de branquia de *L. vannamei* mantenidos a 28°C, la expresión de *Hif1α* es mayor en comparación con los organismos sometidos a hipoxia. También Hardy *et al.*, (2012) encontraron que los niveles de expresión del gen *Hif1α* en tejido de branquia son significativamente mayores bajo condiciones normóxicas que en condiciones de hipoxia, tanto en hembras como machos de *Callinectes sapidus* (cangrejo azul) aclimatados a 25°C.

El decremento en la expresión de este transcrito en condiciones de bajas concentraciones de oxígeno en branquia, contrasta con la mayoría de las observaciones previas de la respuesta a hipoxia en invertebrados, donde los transcritos de *Hif1α* típicamente se incrementan o permanecen sin cambios durante un estrés

hipóxico, mientras las modificaciones traduccionales resultan en el incremento de los niveles de la proteína HIF-1 α (Hardy *et al.*, 2012).

El tejido de branquia juega un rol importante en la respuesta de HIF a hipoxia, ya que los niveles del transcrito *Hif1 α* son siempre altos en este tejido bajo condiciones normóxicas o hipóxicas (Hardy *et al.*, 2012; Piontkivska *et al.*, 2011; Soñanez-Organis *et al.*, 2009).

En el caso de los organismos aclimatados a 20 y 32°C no se observaron diferencias significativas aunque sí se observa un patrón de incremento de la expresión de *Hif1 α* de los controles de aclimatación en comparación con los controles de TCM \acute{a} x, en donde tiende a mantener un perfil de expresión más estable. Esta respuesta puede deberse al mecanismo que utilizan estos organismos para hacerle frente a la hipoxia mediante la depresión metabólica reversible, caracterizada por una reducción drástica, pero equilibrada del estado estacionario entre el suministro y consumo de ATP (Gorr *et al.*, 2006).

Este gen fue sobre expresado en las tres temperaturas de aclimatación en los organismos control, por lo que *Hif1 α* es un gen esencial en los procesos de aclimatación de los organismos (Kawabe y Yokoyama, 2012).

En los organismos sometidos a TCM \acute{a} x aclimatados a 20°C no se encontraron diferencias en la expresión de *Hif1 α* . Esto quizá se deba a que los organismos que son aclimatados a temperaturas más frías, tienen una temperatura corporal baja, reduciendo con ello sus tasa metabólica y requerimientos de oxígeno (Gorr *et al.*, 2010; Kawabe y Yokoyama, 2012). Por lo que el mantener bajos requerimientos de oxígeno le permiten responder ante un incremento gradual en la temperatura como el que representa la TCM \acute{a} x manteniendo el mismo nivel de expresión independientemente de la condición (ablacionados y no ablacionados) de los organismos.

En los organismos aclimatados a 26°C sometidos a TCM \acute{a} x se observan diferencias significativas en la expresión de los organismos ablacionados (unilateral y bilateralmente) en comparación con los no ablacionados. Estos organismos presentan una estrategia de conservación de energía, por lo que la ablación de los pendúnculos

oculares puede estar causando un desequilibrio metabólico, lo cual genera la sobre expresión del gen, ya que está actuando como un factor adicional a la elevación de la temperatura. Sin embargo deben realizarse evaluaciones de la expresión de este gen en organismos ablacionados unilateral y bilateralmente aclimatados a las diferentes temperaturas sin ser sometidos a TCMáx para poder evaluar si el efecto proviene directamente de la ablación o de la temperatura de aclimatación.

7.4 Expresión relativa de Na^+/K^+ ATPasa.

El camarón blanco es un organismo eurihalino hiperosmorregulador capaz de tolerar un amplio rango de salinidades que van de 1 a 40 psu, donde un cambio en la salinidad no afecta el rendimiento de su crecimiento ni la respuesta fisiológica debido al gasto energético destinado a la osmorregulación (Li *et al.*, 2011, 2009). Su presión osmótica se encuentra entre los 603 a 822 mOsm Kg⁻¹ bajo diferentes salinidades (10, 26 y 40 psu), lo cual se encuentra dentro del rango entre 150 a 1200 mOsm para especies marinas eurihalinas.

La capacidad osmorregulatoria en crustáceos es determinada por la osmolaridad de la hemolinfa en comparación con la del ambiente en el que habitan. Ésta capacidad osmoregulatoria también puede evaluarse midiendo la cantidad de iones disueltos en la hemolinfa, o la expresión de la Na^+/K^+ ATPasa en tejido de branquia (Romano y Zeng, 2012; Uranga, 2012).

En este estudio se observó una sobre expresión del gen Na^+/K^+ ATPasa, sin embargo, estas diferencias no fueron significativas en la expresión relativa de este gen en los controles no ablacionados de aclimatación y sometidos a TCMáx a salinidad constante (35 psu), independientemente de la temperatura de aclimatación. La inducción de este gen en el tejido de branquia coincide con lo reportado por Li *et al.*, (2009), quien menciona que Na^+/K^+ ATPasa se expresa principalmente en el tejido de branquia bajo condiciones de salinidad de (5, 26 y 38 psu), ya que es el sitio primario para la regulación iónica y osmótica.

Los niveles de expresión de este gen se mantuvieron bajos en el tejido de branquia, contrario a lo reportado por Li *et al.*, (2009) quienes encontraron que la expresión relativa es alta en músculo y branquia bajo salinidades de 5, 26 y 38 psu.

Hasta la fecha no existen reportes que hayan evaluado el efecto de la temperatura crítica máxima y/o ablación sobre la expresión del gen Na^+/K^+ ATPasa. Re *et al.*, (2006) menciona que la temperatura es un factor que modifica la respuesta fisiológica de los organismos acuáticos, determinando con ello la distribución y sobrevivencia de los mismos. Este factor afecta el metabolismo de los organismos en todas las etapas del ciclo de vida, por lo que se esperaría que hubiera un efecto sobre la expresión de este transcrito.

Al evaluar el efecto de la ablación se observó que a 20°C los organismos ablacionados presentaron diferencias significativas en la expresión de este gen. Esto debido quizá al rol que desempeña la Na^+/K^+ ATPasa en el mantenimiento de la estructura y fluidez de la membrana, ya que esta membrana lipídica responde inmediatamente a los cambios térmicos cuando los organismos se encuentran a bajas temperaturas (Po y Lannig, 2009).

Por otra parte, el mantener niveles de expresión bajos podría deberse a un efecto de coregulación de genes entre *Hif1 α* y Na^+/K^+ ATPasa, ya que *Hif1 α* es un gen que ante condiciones hipóxicas al generarse una depresión metabólica suprime drásticamente las funciones celulares más caras energéticamente (por ejemplo: la síntesis de proteínas, la degradación de proteínas y las ATPasas con motivos iónicos), reduciendo de este modo el consumo total de ATP, para que coincida con la reducción en el suministro del mismo, para mantener un estado homeostático (Gorr *et al.*, 2006; Hardy *et al.*, 2012). La bomba de Na^+/K^+ ATPasa es una de las principales enzimas que requiere de un gran gasto de energía para llevar a cabo el bombeo de iones de Na^+ y K^+ dentro y fuera de la célula, por lo que su expresión puede estar siendo suprimida por el gen *Hif1 α* (Figura 25 y 27). Sin embargo es importante realizar un ensayo más a fondo sobre la expresión de este gen para poder elucidar cuál es el efecto de la temperatura y/o ablación sobre la expresión de Na^+/K^+ ATPasa y si *Hif1 α* está jugando un rol determinante en su expresión.

Capítulo 8. Conclusiones

Los genes de referencia *L8* y *Ef1 α* son los genes más estables en el tejido de branquia bajo las temperaturas de aclimatación de 20, 26 y 32°C, así como bajo la condición de los organismos (ablacionados y no ablacionados), por lo que pueden ser utilizados como genes de referencia candidatos cuando se realicen evaluaciones de estrés térmico y ablación en *L. vannamei*.

El estrés térmico agudo al que se sometió a los organismos indujo la expresión de genes involucrados en estrés térmico, hipoxia y capacidad osmoregulatoria en tejido de branquia de *L. vannamei*. Esto aunado a que la ablación de pedúnculo ocular causa un desbalance metabólico en los organismos, como se observa en los resultados de sobre expresión de los genes evaluados en este trabajo.

El gen *Hsp70* fue inducido en tejido de branquia de organismos ablacionados y no ablacionados aclimatados a 20, 26 y 32°C y sometidos a estrés térmico agudo. No se presentaron diferencias significativas en los controles no ablacionados de aclimatación y sometidos a TCM \acute{a} x, por lo que la temperatura de aclimatación no presentó un efecto directo sobre la expresión de este gen. Sin embargo, la ablación de pedúnculo ocular, mostró un efecto significativo sobre la expresión de *Hsp70* bajo las temperaturas de aclimatación de 20 y 32°C en los organismos sometidos a TCM \acute{a} x. En general, *Hsp70* es un gen que se expresa rápidamente actuando como primer línea de defensa ante el daño celular causado por el estrés térmico agudo, por lo cual puede ser utilizado como biomarcador debido a su alta sensibilidad a fluctuaciones de temperatura.

La expresión del gen *Hsp90* se mantuvo a niveles bajos en controles de aclimatación y sometidos a estrés térmico agudo bajo las condiciones de 20 y 26°C, así como en los controles de aclimatación de 32°C. Mientras que en organismos no ablacionados de 32°C y sometidos a TCM \acute{a} x se presentó una expresión significativa de este gen. Por otra parte, la temperatura de aclimatación de 32°C, aunada al efecto de la ablación, ejerce un efecto significativo en la expresión de *Hsp90*, por lo que organismos aclimatados a altas temperaturas presentan una expresión estadísticamente significativa en comparación con organismos aclimatados a temperaturas más bajas.

Hsp90 es un gen que presenta niveles bajos de expresión y tiende a mantenerse estable ante condiciones de estrés térmico agudo causado por estrés térmico agudo.

El gen *Hif1 α* presentó una mayor expresión en temperaturas más bajas reduciendo sus niveles de expresión en organismos no ablacionados sometidos a estrés térmico agudo. También se observó que este gen fue sobre expresado en las tres temperaturas de aclimatación, por lo que es un gen esencial en los procesos de aclimatación de los organismos independientemente de la condición, la cual no tuvo efecto sobre la expresión relativa del transcrito.

En el caso del gen *Na⁺/K⁺ ATPasa* se observaron bajos niveles de expresión sin diferencias significativas en las tres temperaturas de aclimatación en controles de aclimatación y controles de TCMáx. En la temperatura de aclimatación de 20°C, al ser sometidos a estrés térmico agudo, se observó una mayor expresión de este gen, quizá por la necesidad de mantener el potencial, fluidez e integridad de la membrana plasmática ante el estrés causado por la elevación de la temperatura.

La regulación de la expresión de los genes evaluados en este trabajo, se vio afectada en los organismos ablacionados, lo cual indica que la eliminación de parte del sistema endócrino de *L. vannamei* debido a la ablación causa un desbalance energético y una des-regulación de los genes en los organismos expuestos a estrés térmico, los cuales se encuentran participando en procesos de regulación iónica y permeabilidad de membrana, hipoxia y estrés térmico.

Lista de referencias

- Andersen, C. L., Jensen, J. L., y Ørntoft, T. F. (2004). Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data : A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization , Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Research*, 64(15), 5245–5250.
- Aparicio-Simón, B., Piñón, M., Racotta, R., y Racotta, I. S. (2010). Neuroendocrine and metabolic responses of Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to acute handling stress. *Aquaculture*, 298(3), 308–314.
- Aursnes, I. a, Rishovd, A. L., Karlsen, H. E., y Gjoen, T. (2011). Validation of reference genes for quantitative RT-qPCR studies of gene expression in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) during temperature stress. *BMC Research Notes*, 4(1), 104.
- Axtner, J., y Sommer, S. (2009). Validation of internal reference genes for quantitative real-time PCR in a non-model organism, the yellow-necked mouse, *Apodemus flavicollis*. *BMC research notes*, 2(1), 264.
- Briggs, M., Funge-Smith, S., Subasinghe, R., y Phillips, M. (2004). Introductions and Movement of *Penaeus Vannamei* and *Penaeus Stylirostris* in Asia and the Pacific. *Rap Publication*, 10(2004), 32.
- Bruick, R. K. (2003). Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. *Genes & Development*, 17(21), 2614–2623.
- Bustin, S. A, Benes, V., Nolan, T., y Pfaffl, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR -a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34(3), 597–601.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., y Wittwer, C.T. (2009). The MIQE Guidelines : Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622.
- Cai, X., Huang, Y., Zhang, X., Wang, S., Zou, Z., Wang, G., Wang, Y., y Zhang, Z. (2014). Cloning, characterization, hypoxia and heat shock response of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) from the small abalone *Haliotis diversicolor*. *Gene*, 534(2), 256–264.
- Camacho-Sánchez, M., Burraco, P., Gómez-Mestre, I., y Leonard, J. A. (2013). Preservation of RNA and DNA from mammal samples under field conditions. *Molecular Ecology Resources*, 13(4), 663–673.

- Dallas, H. (2008). Water temperature and riverine ecosystems: An overview of knowledge and approaches for assessing biotic responses, with special reference to South Africa, *34*(3), 393–404.
- David, E. (2007). *Reponses ecophysiologiques et genetiques de L'huître creus Crassostrea gigas aux stress environnementaux, en milieu controle et en milieu naturel*. These au Doctorat des Sciences de la Mer. Institut Universitaire Européen de la Mer, 316.
- Dhar, A. K., Bowers, R. M., Licon, K. S., Veazey, G., y Read, B. (2009). Validation of reference genes for quantitative measurement of immune gene expression in shrimp. *Molecular Immunology*, *46*(8), 1688–1695.
- Dhar, A. K., Roux, M. M., y Klimpel, K. R. (2002). Quantitative assay for measuring the Taura syndrome virus and yellow head virus load in shrimp by real-time RT-PCR using SYBR Green chemistry. *Journal of Virological Methods*, *104*(1), 69–82.
- FAO. (2013). *Penaeus vannamei* (Boone, 1931). Programa de información de especies acuáticas. Departamento de Pesca y Acuicultura (en línea). Recuperado el 1 de Agosto de 2014, de: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/es
- Feder, M. E., y Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, *61*(1), 243–282.
- Figueiredo, A., Loureiro, A., Batista, D., Monteiro, F., Várzea, V., Pais, M. S., Gichuru, E.K., y Silva, M. C. (2013). Validation of reference genes for normalization of qPCR gene expression data from *Coffea* spp. hypocotyls inoculated with *Colletotrichum kahawae*. *BMC Research Notes*, *6*(1), 388.
- Freire, C. a, Onken, H., y McNamara, J. C. (2008). A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, *151*(3), 272–304.
- Galiveti, C. R., Rozhdestvensky, T. S., Brosius, J., Lehrach, H., y Konthur, Z. (2011). Application of housekeeping npcRNAs for quantitative expression analysis of human transcriptome by real-time PCR. *RNA*, *16*(2), 450–461.
- González, R. a., Díaz, F., Licea, A., Re, A. D., Sánchez, L. N., y García-Esquivel, Z. (2010). Thermal preference, tolerance and oxygen consumption of adult white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) exposed to different acclimation temperatures. *Journal of Thermal Biology*, *35*(5), 218–224.

- Gorr, T. a, Wichmann, D., Hu, J., Hermes-Lima, M., Welker, a F., Terwilliger, N., Wren, J.F., Viney, M., Morris, S., Nilsson, G.E., Deten, A., Soliz, J., y Gassmann, M. (2010). Hypoxia tolerance in animals: biology and application. *Physiological and Biochemical Zoology: PBZ*, 83(5), 733–752.
- Gorr, T., Gassmann, M., y Wappner, P. (2006). Sensing and responding to hypoxia via HIF in model invertebrates. *Journal of Insect Physiology*, 52(4), 349–364.
- Greenway S.C., y Storey, K.B. (1999). The effect of prolonged anoxia on enzyme activities in oysters (*Crassostrea virginica*) at different seasons. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 242(2), 259-272.
- Guo, B., Wang, F., Dong, S., y Hou, C. (2010a). Effects of rapid temperature changes on HK, PK and HSP70 of *Litopenaeus vannamei* in different seasons. *Journal of Ocean University of China*, 9(3), 303–308.
- Guo, B., Wang, F., Dong, S., Dong, Y., y Tian, X. (2010b). The effects of cyclical temperature changes on growth and physiological status of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International*, 18(5), 921–932.
- Gusmão, D. S. (2011). *Temperature tolerance and potential impacts of climate change on marine and stuarine organisms*. Tesis de Maestría en Ecología Marina. Universidad de Lisboa, Facultad de Ciencias, 94.
- Gutierrez, L., Mauriat, M., Guénin, S., Pelloux, J., Lefebvre, J.F., Louvet, R., Rusterucci, C., Moritz, T., Guerineau, F., Bellini, C., y Van Wuytswinkel, O. (2008). The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 6(6), 609–618.
- Hardy, K. M., Follett, C. R., Burnett, L. E., y Lema, S. C. (2012). Gene transcripts encoding hypoxia-inducible factor (HIF) exhibit tissue- and muscle fiber type-dependent responses to hypoxia and hypercapnic hypoxia in the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 163(1), 137–146.
- Heidbreder, M., Fröhlich, F., Jöhren, O., Dendorfer, A., Qadri, F., y Dominiak, P. (2003). Hypoxia rapidly activates HIF-3 α mRNA expression. *The FASEB journal*, 17(11), 1541–1543.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., y Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, 8(2), R19.

- Henry, R. P., Lucu, C., Onken, H., y Weihrauch, D. (2012). Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Frontiers in Physiology*, 3, 1–33.
- Kawabe, S., y Yokoyama, Y. (2012). Role of hypoxia-inducible factor α in response to hypoxia and heat shock in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biotechnology*, 14(1), 106–119.
- Kültz, D. (2005). Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annual Review of Physiology*, 67(1), 225–257.
- Kumlu, M., Türkmen, S., y Kumlu, M. (2010). Thermal tolerance of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Penaeidae) acclimated to four temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 35(6), 305–308.
- Kumlu, M., Türkmen, S., Kumlu, M., y Eroldoğan, O. T. (2011). Off-season Maturation and Spawning of the Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* in Sub-tropical Conditions. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 11, 15–23.
- Lago-Lestón, A., Ponce, E., y Muñoz, M. E. (2007). Cloning and expression of hyperglycemic (CHH) and molt-inhibiting (MIH) hormones mRNAs from the eyestalk of shrimps of *Litopenaeus vannamei* grown in different temperature and salinity conditions. *Aquaculture*, 270(1), 343–357.
- Leelatanawit, R., Klanchui, A., Uawisetwathana, U., y Karoonuthaisiri, N. (2012). Validation of reference genes for real-time PCR of reproductive system in the black tiger shrimp. *PLoS ONE*, 7(12), e52677.
- Li, E., Arena, L., Chen, L., Qin, J. G., y Van Wormhoudt, A. (2009). Characterization and Tissue-Specific Expression of the Two Glutamate Dehydrogenase cDNAs in Pacific White Shrimp, *Litopenaeus Vannamei*. *Journal of Crustacean Biology*, 29(3), 379–386.
- Li, F., Luan, W., Zhang, C., Zhang, J., Wang, B., Xie, Y., Li, S., y Xiang, J. (2009a). Cloning of cytoplasmic heat shock protein 90 (FchHSP90) from *Fenneropenaeus chinensis* and its expression response to heat shock and hypoxia. *Cell Stress & Chaperones*, 14(2), 161–172.
- Li, E., Arena, L., Lizama, G., Gaxiola, G., Rosas, C., Chen, L., y Van Wormhoudt, A. (2011). Glutamate dehydrogenase and $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase expression and growth response of *Litopenaeus vannamei* to different salinities and dietary protein levels. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 29(2), 343–349.

- Liu, J., Yang, W. J., Zhu, X. J., Karouna-Renier, N. K., y Rao, R. K. (2004). Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Cell stress & chaperones*, 9(3), 313.
- Liu, C.H., Tseng, M.C., y Cheng, W. (2007). Identification and cloning of the antioxidant enzyme, glutathione peroxidase, of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and its expression following *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 23(1), 34–45.
- Livak, K. J., y Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402–408.
- Lo, W.Y., Liu, K.F., Liao, I.C., y Song, Y.L. (2004). Cloning and molecular characterization of heat shock cognate 70 from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Cell Stress & Chaperones*, 9(4), 332–343.
- Luan, W., Li, F., Zhang, J., Wang, B., y Xiang, J. (2009). Cloning and expression of glucose regulated protein 78 (GRP78) in *Fenneropenaeus chinensis*. *Molecular Biology Reports*, 36(2), 289-298.
- Luan, W., Li, F., Zhang, J., Wen, R., Li, Y., y Xiang, J. (2010). Identification of a novel inducible cytosolic Hsp70 gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and comparison of its expression with the cognate Hsc70 under different stresses. *Cell Stress & Chaperones*, 15(1), 83–93.
- Lutterschmidt, W. I., y Hutchison, V. H. (1997a). The critical thermal maximum: data to support the onset of spasms as the definitive end point. *Canadian Journal of Zoology*, 75(10), 1553-1560.
- Lutterschmidt, W. I., y Hutchison, V. H. (1997). The critical thermal maximum: history and critique. *Canadian Journal of Zoology*, 75(10), 1561-1574.
- Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H. N., Vinagre, C., y Diniz, M. S. (2012). HSP70 production patterns in coastal and estuarine organisms facing increasing temperatures. *Journal of Sea Research*, 73, 137–147.
- Palacios, E., Carrefio, D., Rodríguez-Jaramillo, M. C., y Racotta, I.S. (1999). Effect of Eyestalk Ablation on Maturation, Larval Performance, and Biochemistry of White Pacific Shrimp, *Penaeus vannamei*, Broodstock. *Journal of Applied Aquaculture*, 9(3), 1–23.
- Paladino, F. V., Spotila, J. R., Schubauer, J. P., y Kowalski, K. T. (1980). The critical thermal maximum: a technique used to elucidate physiological stress and adaptation in fishes. *Revue Canadienne de Biologie*, 39(2), 115-122.

- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45.
- Pörtner, H. O., y Lannig, G. (2009). Oxygen and capacity limited thermal tolerance. *Fish Physiology*, 27, 143–191.
- Qian, Z., Liu, X., Wang, L., Wang, X., Li, Y., Xiang, J., y Wang, P. (2012). Gene expression profiles of four heat shock proteins in response to different acute stresses in shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 156(3), 211–220.
- Ramos-Cruz, S. (2011). Relaciones biométricas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* Boone 1931 (Decapoda, Penaeidae), para la región del Golfo de Tehuantepec, México. *CICIMAR Océánides*, 26(2), 71–75.
- Ravaux, J., Léger, N., Rabet, N., Morini, M., Zbinden, M., Thatje, S., y Shillito, B. (2012). Adaptation to thermally variable environments: capacity for acclimation of thermal limit and heat shock response in the shrimp *Palaemonetes varians*. *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 182(7), 899–907.
- Re, A. D., Díaz, F., Ponce-Rivas, E., Giffard, I., Muñoz-Marquez, M. E., y Sigala-Andrade, H. M. (2012). Combined effect of temperature and salinity on the Thermotolerance and osmotic pressure of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Journal of Thermal Biology*, 37(6), 413–418.
- Re, A. D., Diaz, F., Sierra, E., Rodríguez, J., y Perez, E. (2005). Effect of salinity and temperature on thermal tolerance of brown shrimp *Farfantepenaeus aztecus* (Ives) (Crustacea, Penaeidae). *Journal of Thermal Biology*, 30(8), 618–622.
- Re, A. D., Díaz, F., y Valdez, G. (2006). Effect of salinity on the thermoregulatory behavior of juvenile blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* Stimpson. *Journal of Thermal Biology*, 31(6), 506–513.
- Romano, N., y Zeng, C. (2012). Osmoregulation in decapod crustaceans: implications to aquaculture productivity, methods for potential improvement and interactions with elevated ammonia exposure. *Aquaculture*, 334, 12–23.
- Rungrassamee, W., Leelatanawit, R., Jiravanichpaisal, P., Klinbunga, S., y Karoonuthaisiri, N. (2010). Expression and distribution of three heat shock protein genes under heat shock stress and under exposure to *Vibrio harveyi* in *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology*, 34(10), 1082–1089.

- Sainz-Hernández, J. C., Racotta, I. S., Dumas, S., y Hernández-López, J. (2008). Effect of unilateral and bilateral eyestalk ablation in *Litopenaeus vannamei* male and female on several metabolic and immunologic variables. *Aquaculture*, 283(1), 188–193.
- Sellars, M. J., Vuocolo, T., Leeton, L. a, Coman, G. J., Degnan, B. M., y Preston, N. P. (2007). Real-time RT-PCR quantification of Kuruma shrimp transcripts: a comparison of relative and absolute quantification procedures. *Journal of Biotechnology*, 129(3), 391–399.
- Somero, G. N. (2010). The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine “winners” and “losers”. *The Journal of Experimental Biology*, 213(6), 912–920.
- Soñanez-Organis, J. G., Peregrino-Uriarte, A. B., Gómez-Jiménez, S., López-Zavala, A., Forman, H. J., y Yepiz-Plascencia, G. (2009). Molecular characterization of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and tissue-specific expression under hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 150(3), 395–405.
- Sun, P. S., Soderlund, M., Venzon, N. C., Ye, D., y Lu, Y. (2007). Isolation and characterization of two actins of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Marine Biology*, 151(6), 2145–2151.
- Sun, S., Xie, H., Sun, Y., Song, J., y Li, Z. (2012). Molecular characterization of gap region in 28S rRNA molecules in brine shrimp *Artemia parthenogenetica* and planarian *Dugesia japonica*. *Biochemistry (Moscow)*, 77(4), 411-417.
- Uawisetwathana, U., Leelatanawit, R., Klanchui, A., Prommoon, J., Klinbunga, S., y Karoonuthaisiri, N. (2011). Insights into eyestalk ablation mechanism to induce ovarian maturation in the black tiger shrimp. *PloS One*, 6(9), e24427.
- Uranga, S. C. (2012). *Localización y expresión de la ATPasa Na⁺/K⁺ en branquias de Litopenaeus vannamei aclimatado a diferentes salinidades y temperaturas*. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Baja California. 85.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., y Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), 1–11.
- Vernberg, F. J., y Silverthorn, S. U. (1979). Temperature and osmoregulation in aquatic species. *Mechanisms of Osmoregulation in Animals*. Wiley, New York, New York, USA. 537-562.

- Wang, L., Liu, Y., Wang, W.N., Mai, W.J., Xin, Y., Zhou, J., He, W.Y., Wang, A.L., y Sun, R.Y. (2011). Molecular characterization and expression analysis of elongation factors 1A and 2 from the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Molecular Biology Reports*, 38(3), 2167–2178.
- Wang, L., Wu, J., Wang, W.N., Cai, D.X., Liu, Y., y Wang, A.L. (2012). Glutathione peroxidase from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: characterization and its regulation upon pH and Cd exposure. *Ecotoxicology*, 21(6), 1585–1592.
- Wong, M.L., y Medrano, J.F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75.
- Zenteno-Savín, T., Saldierna, R., y Ahuejote-Sandoval, M. (2006). Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 142(3), 301–308.
- Zhenyu, G., Chuanzhen, J., y Jianhai, X. (2004). Heat-shock protein 70 expression in shrimp *Fenneropenaeus chinensis* during thermal and immune-challenged stress. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 22(4), 386–391.
- Zhou, J., Wang, L., Xin, Y., Wang, W.N., He, W.Y., Wang, A.L., y Liu, Y. (2010). Effect of temperature on antioxidant enzyme gene expression and stress protein response in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Thermal Biology*, 35(6), 284–289.
- Zhou, J., Wang, W.N., He, W.Y., Zheng, Y., Wang, L., Xin, Y., Liu, Y., y Wang, A.L. (2010a). Expression of HSP60 and HSP70 in white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in response to bacterial challenge. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(3), 170–178.
- Zhou, J., Wang, W.N., Ma, G.Z., Wang, A.L., He, W.Y., Wang, P., Liu, Y., Liu, J.J., y Sun, R.Y. (2008). Gene expression of ferritin in tissue of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* after exposure to pH stress. *Aquaculture*, 275(1-4), 356–360.

Anexo 1: Protocolos estandarizados

1.1 Protocolo de extracción de RNA

a) Homogenización del tejido:

1. Preparar tubos eppendorf de 1.5 ml con 100 mg de perlas de vidrio.
2. Agregar 1 ml de Tri Reagent (SIGMA-Ambion)
3. Pesar 50-100 mg de tejido y colocar en los tubos preparados anteriormente y etiquetarlos.
4. Homogenizar en un homogeneizador de tejidos durante el tiempo deseado y colocar en hielo. Para branquia y músculo 2 ciclos de 30 segundos cada uno y hepatopáncreas 1 ciclo de 30 segundos.
Nota: Entre cada ciclo los tubos deben permanecer en hielo.
5. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
6. Centrifugar a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente transferir el sobrenadante a un tubo nuevo debidamente etiquetado.

b) Extracción de RNA:

7. Adicionar 200 µl de cloroformo por 1 ml de Tri Reagent utilizado, vortexear 15 segundos e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Centrifugar a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C y transferir la fase acuosa a un tubo nuevo debidamente marcado.
Nota: Tener cuidado de no llevarse trazas de la interfase o perlas de vidrio.

c) Precipitación y lavado del RNA:

9. Adicionar 500 µl de etanol al 95% por 1 ml de Tri Reagent utilizado y agitar cuidadosamente de 5 a 10 segundos. Incubar durante 20 minutos a -80°C.
10. Centrifugar a 13, 000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente descartar con cuidado el sobrenadante.
Nota: Tener cuidado de no tirar el pellet.
11. Adicionar 1 ml de etanol al 75% y resuspender el pellet.
Nota: lavar el pellet dos veces, repetir pasos 10 y 11.
12. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 minutos a 4°C, retirar sobrenadante por decantación y dejar secar el pellet.
13. Resuspender el pellet de RNA en agua libre de nucleasas y almacenar a -80°C.
Nota: Pellets de tamaño mediano y grande en 100 µl de H₂O libre de nucleasas.
Pellets de tamaño pequeño en 50 µl de H₂O libre de nucleasas.
14. Realizar una alícuota de 10 µl para cuantificación en Nanodrop y electroforesis en gel de agarosa al 1.0%.

1.2 Protocolo para Purificación de RNA (Tratamiento con DNAsa)

a) Digestión con DNAsa:

1. Preparar tubos para cada muestra y etiquetar adecuadamente.

Reactivos	1Rx
RNA	[Deseada en μ l]
RQ1 DNAsa	1u/ μ g RNA
RQ1 Buffer 10x	1 μ l/10 vol. final
H2O	Variable

2. Incubar a 37°C durante 30 minutos.
3. Centrifugar durante 30 segundos a 2,000 rpm y colocar en hielo inmediatamente.
4. Agregar 1 μ l por μ g de RNA de solución STOP y anotar el volumen final.
5. Incubar a 65°C durante 10 minutos.
6. Centrifugar 30 segundos a 6,000 rpm y colocar en hielo inmediatamente.

b) Precipitación y Purificación de RNA:

7. Agregar 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M pH 5.2
8. Adicionar 3 volúmenes de etanol absoluto.
9. Agitar cuidadosamente.
10. Dejar precipitar a -80°C por 1 hora.
11. Centrifugar a 13,000 rpm por 10 minutos a 4°C.
12. Descartar sobrenadante por decantación.
13. Lavar el pellet con 200 μ l de etanol al 75% (frío).
14. Agitar cuidadosamente y dejar reposar 10 minutos.
15. Centrifugar a 7,500 rpm por 10 minutos a 4°C.
16. Eliminar el sobrenadante por decantación.
17. Secar el pellet por 10 minutos a temperatura ambiente.
18. Resuspender el pellet de RNA en H₂O libre de nucleasas.
Nota: Resuspender en relación 1:2
19. Dosificar y cuantificar
Nota: Realizar electroforesis en gel de agarosa al 1.0% y PCR punto final para verificar que se haya eliminado el DNA genómico o trazas del mismo mediante la purificación con DNAsa.

1.3 Protocolo para transcripción reversa (Síntesis de cDNA) con kit ImProm-II™ Reverse Transcription System

a) Combinación de primer con RNA blanco y desnaturalización

1. Descongelar el RNA experimental y el control positivo de kanamicina en hielo, así como los demás componentes a utilizar.
2. Combinar el RNA experimental (1.0 µg) con el oligo dt y agua libre de nucleasas. Volumen final 5 µl.

Control positivo Kanamicina	1 rx
1.2 kb Kanamicina	2 µl
Oligo dt ₁₅ primer (0.5µg/rx)	1 µl
H ₂ O libre de nucleasas	2 µl
Volumen final	5 µl

Control negativo	1 rx
Oligo dt ₁₅ primer (0.5µg/rx)	1 µl
H ₂ O libre de nucleasas	4 µl
Volumen final	5 µl

Control experimental	1 rx
Rna experimental (Hasta 1µg/rx)	X µl
Oligo dt ₁₅ primer (0.5µg/rx)	1.0 µl
H ₂ O libre de nucleasas	X µl
Volumen final	5 µl

3. Incubar a 70°C por 5 minutos. Colocar en hielo inmediatamente y centrifugar para colectar el condensado.

b) Transcriptasa reversa

4. Preparar el Mix Improm II, vortexear y mantener en hielo hasta dispensar.

Reacción experimental	1 rx
H ₂ O libre de nucleasas	5.3 µl
Improm II 5x Rx Buffer	4.0 µl
MgCl ₂	3.2 µl
dNTP Mix	1.0 µl
RNAsin recombinante	0.5 µl
Improm II Transcriptasa reversa	1.0 µl
Volumen final	15 µl

Control negativo	1 rx	Control positivo	1 rx
H2O libre de nucleasas	5.8 μ l	H2O libre de nucleasas	4.8 μ l
Improm II 5x Rx Buffer	4.0 μ l	Improm II 5x Rx Buffer	4.0 μ l
MgCl ₂	3.2 μ l	MgCl ₂	3.2 μ l
dNTP Mix	1.0 μ l	dNTP Mix	1.0 μ l
RNAsin recombinante	0.5 μ l	RNAsin recombinante	0.5 μ l
Volumen final	15 μl	Improm II Transcriptasa reversa	1.0 μ l
		Volumen final	15 μl

5. Adicionar 15 μ l de los mix preparados a cada reacción correspondiente incubada anteriormente a 70°C, para obtener un volumen final de 20 μ l tanto para la reacción experimental como para los controles.
6. **Alineamiento:** Incubar a 25°C durante 5 minutos.
7. **Extensión:** Incubar a 42°C durante 1 hora.
8. **Inactivación de transcriptasa reversa:** Incubar a 70°C por 15 minutos.
9. Verificar mediante PCR punto final.

1.4 Protocolo PCR en tiempo real (qPCR) para realizar curvas de eficiencia

a) Diseño de placa

La placa debe realizarse de acuerdo a tus especificaciones en el programa BIO-Rad CFX Manager.

b) Preparación de MIX para qPCR y diluciones seriadas

1. IQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad)

Componente	Volumen/reacción	[Final]
Supermix (2x)	5 µl	1x
Primer forward (10 µM)	0.2 µl	0.2 µM
Primer reverse (10 µM)	0.2 µl	0.2 µM
H ₂ O libre de nucleasas	1.6 µl	-
Templado	3 µl	30- 50 ng
Volumen total	10 µl	-

2. Preparar 6 diluciones seriadas 1:5 con cDNA experimental.
Nota: homogeneizar perfectamente en cada dilución seriada y diluir en H₂O libre de nucleasas.
3. Distribuir 7 µl del master mix en cada pozo de la placa de 96 pozos (Bio-Rad) de acuerdo a la distribución del diseño de placa realizado con anterioridad.
4. Colocar el templado (3 µl) de la dilución correspondiente en los pozos de la placa.
Nota: evitar la formación de burbujas.
5. Sellar la placa con el Microsello autoadherible específico para las placas, teniendo cuidado de no tocar la superficie del mismo.
6. Colocar la placa en el termociclador y ajustar al siguiente programa:

Programa estandarizado			
Desnaturalización	95°C	3'	
Desnaturalización	95°C	10"	
Alineamiento	60°C	30"	40 ciclos
Curva de disociación	95°C	10"	
	65°C-95°C	5"	Incremento 0.5°C

7. Al finalizar la corrida de qPCR almacenar la placa a 4°C.

Anexo 2: Preparación de soluciones

2.1 Solución casera para preservación de ácidos nucleicos (Buffer NAP) (1.5 L)

Reactivos:

40 ml EDTA 0.5M pH 8.0
25 ml Citrato de sodio 1M
700 g Sulfato de amonio
935 ml Agua MilliQ estéril.

Preparación:

- 1) Disolver el agua destilada con el sulfato de amonio, manteniendo en agitación constante.
- 2) Agregar el citrato de sodio y el EDTA
- 3) Ajustar pH a 5.2 con H_2SO_4 (20 gotas=1 ml)
- 4) Transferir a un frasco Schott, etiquetar y almacenar a temperatura ambiente.

2.2 EDTA 0.5M (500 ml)

Reactivos:

93.06 g de EDTA
500 ml de agua MilliQ

Preparación:

- 1) Colocar el EDTA en 300 ml de agua y mantener en agitación hasta disolver.
 - 2) Ajustar pH a 8.0 NaOH
 - 3) Aforar hasta 500 ml con el agua restante.
- Nota: mientras la solución está disolviéndose se debe estar ajustando el pH de lo contrario no se disolverá.
- 4) Transferir a un frasco Schott, etiquetar y almacenar a temperatura ambiente.

2.3 Solución stock TAE 50X (1 L)

Reactivos:

242 g de Tris Base
57.1 ml de Ácido acético
100 ml de EDTA 0.5M
750 ml aproximadamente de agua MilliQ

Preparación:

- 1) Disolver el Tris base en el agua MilliQ
- 2) Colocar el ácido acético y el EDTA
- 3) Ajustar pH a 8.5
- 4) Aforar a 1 L
- 5) Transferir a un frasco Schott, etiquetar y almacenar a temperatura ambiente.

2.4 Agua DEPC (1L)

Reactivos:

1 ml Dietil pirocarbonato 0.1% (SIGMA)
999 ml de agua MilliQ

Preparación:

- 1) Disolver el DEPC en el agua y mantener en agitación durante toda la noche.
- 2) Colocar en frascos Schott previamente etiquetado
- 3) Autoclavear durante 20 minutos
- 4) Almacenar a temperatura ambiente.

2.5 Geles de agarosa al 1% y 1.5%

Reactivos:

1 g / 1.5 g Agarosa grado Biología molecular
100 ml de TAE 1X

Preparación:

- 1) Mezclar la agarosa con el buffer TAE
- 2) Calentar durante 1 minuto y agitar perfectamente.
- 3) Esperar a que se encuentre tibio y verter en la canastilla para gel.
- 4) Dejar polimerizar y retirar el peine con cuidado.