

# **UNIVERSIDAD DE SONORA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**La ciclofilina D del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*):  
caracterización del transcrito e identificación de la proteína**

**TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA**

**Que para obtener el Título de:**

**QUÍMICO BIOLÓGO CLÍNICO**

**Presenta:**

**1942**

**Martí David Wilson Verdugo**

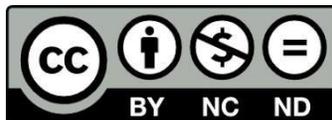
**Hermosillo, Sonora**

**junio de 2017**

# Repositorio Institucional UNISON



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



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

## APROBACIÓN

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, en especial a mis padres y mis hermanos: por su amor incondicional y su eterno apoyo en cada uno de mis días. Ustedes son el motor y el pilar que me permiten seguir adelante y enfrentar con valor cada nuevo reto que se presenta.

A la Dra. Adriana Muhlia: por todo su apoyo, confianza y, por ser la primera persona en mostrarme verdaderamente lo que significa ser un científico; las cosas maravillosas y las no tan maravillosas esta bella profesión.

A la Q.B. Sandra Araujo: por su asesoría técnica durante todo este tiempo.

A mis amigos del laboratorio: Erick, Jesús, Orlando, Cindy, Kathia, Mariana y Ofelia; por todo el apoyo ofrecido. Sé que sin ustedes mis días en CIAD no hubieran sido tan divertidos como lo fueron.

A mis amigos químicos: Adriana, Eva, Ivonne, Lucia, Mara, Minerva, Rosa y Juan Manuel. En gran parte fue gracias a ustedes que llegué hasta aquí.

A Conacyt, por los recursos brindados al laboratorio y a mí por medio del proyecto con clave 241670: "Bioenergética y Regulación de la Función Respiratoria de las Mitocondrias del Camarón".

A la Universidad de Sonora: por cumplir con creces su labor como Alma Mater, brindándome las alas que todo búho necesita para emprender el vuelo.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo: por darme el primer acercamiento al mundo de la ciencia, así como proporcionar todo lo necesario para llevar a cabo el presente trabajo.

A los anteriormente mencionados, así como también a cada una de las personas e instituciones que en algún momento me han ayudado y que no menciono en este apartado, muchísimas gracias. Porto de manera orgullosa la confianza que todos ustedes han depositado en mí; y prometo que siempre daré mi mayor esfuerzo para honrar esa confianza.

## CONTENIDO

LISTA DE TABLAS .....	1
LISTA DE FIGURAS .....	2
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
HIPÓTESIS .....	6
OBJETIVOS .....	7
ANTECEDENTES.....	8
El Camarón Blanco del Pacífico .....	8
La Función Mitocondrial .....	9
Enzimas Isomerasas .....	10
La Transición de la Permeabilidad Mitocondrial .....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
Identificación y Caracterización de la Secuencia Completa de ADNc de la Ciclofilina D en el Camarón Blanco .....	22
Expresión Relativa del Transcrito de Ciclofilina D en Diferentes Tejidos del Camarón .....	25
Análisis Filogenético y Modelación in silico de la Estructura de la Ciclofilina D del Camarón Blanco .....	25
Identificación de la Proteína en Extractos Proteicos de las Mitocondrias Aisladas del Camarón .....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
Identificación y caracterización de la secuencia completa del ADNc de la ciclofilina D en el camarón blanco.....	29
Evaluación de la expresión relativa del transcrito de ciclofilina D en diferentes tejidos del camarón .....	32
Caracterización parcial de la proteína deducida de la ciclofilina D: sus relaciones filogenéticas y su modelo estructural predictivo .....	33
Identificación de la proteína en extractos proteicos de las mitocondrias aisladas del camarón en condiciones de hipoxia-reoxigenación .....	40
PERSPECTIVAS .....	45
BIBLIOGRAFÍA.....	46

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos específicos diseñados para la amplificación de la secuencia de la ciclofilina D del camarón blanco.....	30
Tabla 2. Secuencias de ciclofilina D utilizadas para el análisis filogenético y porcentajes de identidad con la secuencia del camarón blanco .....	33

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía de <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	9
Figura 2. Clasificación de las isomerasas por la NC-UIBM.....	11
Figura 3. Representación gráfica de la reacción catalizada por las peptidil-prolil isomerasas....	13
Figura 4. Primer modelo molecular del poro de transición de la permeabilidad.....	16
Figura 5. Modelo del poro formado por dímeros de la ATP sintasa.....	17
Figura 6. Modelo del poro de transición de la permeabilidad formado por la ATP sintasa, el acarreador de fosfatos y ANT que es regulado por ciclofilina D.....	18
Figura 7. Integridad y limpieza de las muestras de ARN total.....	29
Figura 8. Secuencia nucleotídica y proteína deducida de la ciclofilina D del camarón blanco <i>L. vannamei</i> .....	31
Figura 9. Expresión del transcrito de ciclofilina D en hepatopáncreas, músculo, pleópodos, branquias, pedúnculo ocular, corazón y cordón nervioso del camarón blanco.....	32
Figura 10. Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de la ciclofilina D en diversas especies.....	34
Figura 11. Árbol filogenético de la ciclofilina D.....	36
Figura 12. Comparación entre la estructura cristalográfica de la ciclofilina D humana y el modelo predictivo de la ciclofilina D del camarón.....	38
Figura 13. Representación del sitio activo de la ciclofilina D del camarón blanco, usando como templado la estructura de la ciclofilina D humana.....	39
Figura 14. Representación del sitio de unión a ciclosporina A de la ciclofilina D del camarón.....	40
Figura 15. Separación de proteínas mitocondriales por SDS-PAGE.....	41
Figura 16. Inmunodetección de la ciclofilina D del camarón blanco en las muestras control, hipoxia 6 h, hipoxia 12 h, reoxigenación 6 h (Re 6H) y reoxigenación 12 h (Re 12H).....	42

## RESUMEN

La ciclofilina D es la isoforma mitocondrial de la familia de las ciclofilinas (EC 5.2.1.8), su actividad enzimática consiste en catalizar la interconversión de los isómeros cis/trans en los enlaces peptídicos que contienen prolina. Es ampliamente aceptado que la función biológica de esta enzima es permitir el correcto plegamiento de proteínas recién importadas a la matriz mitocondrial, tal y como hacen otras ciclofilinas en otros compartimientos celulares. Sin embargo, la ciclofilina D también participa como un elemento regulador importante del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial, el cual se ha asociado a procesos como la lesión por isquemia-reperfusión, la homeostasis del calcio intracelular, la respuesta celular al estrés oxidativo, hipertensión, enfermedad de Alzheimer, entre otros. A pesar de que existe mucha información disponible acerca de la ciclofilina D, la mayoría de ella proviene de estudios realizados en mamíferos. La información acerca de esta proteína en crustáceos es aún escasa. Por lo anterior, este estudio pretende aportar conocimiento sobre esta enzima por primera vez secuencia de ADNc correspondiente al transcrito de la ciclofilina D del camarón, el cual posee una longitud de 774 pb, tiene un péptido señal dirigido a la mitocondria y se expresa de manera ubicua en todos los tejidos. La proteína deducida completa de este transcrito cuenta con 196 aminoácidos, una masa molecular estimada de 18 kDa y posee todos los dominios y características de un miembro de la familia de las ciclofilinas. Además, esta proteína del camarón tiene una identidad de más del 70% con secuencias pertenecientes a la ciclofilina D de otros organismos, lo cual sugiere que las ciclofilinas mitocondriales cumplen un papel de suma importancia en estas especies. Por otro lado, se realizó un ensayo de inmunodetección de esta proteína en extractos proteicos mitocondriales del camarón mediante el uso de anticuerpos específicos contra ciclofilina D humana, en el cual se compararon muestras control con muestras sometidas a tratamientos de 12 h de hipoxia seguidas de 12 h de reoxigenación. El ensayo comparativo de inmunodetección no arrojó diferencias apreciables al comparar muestras control con muestras correspondientes a tratamientos con 6 h de hipoxia, 12 h de hipoxia, 6 h de reoxigenación y 12 h de reoxigenación. Sin embargo, estos resultados no permiten descartar una posible función de esta proteína en procesos patológicos asociados a estrés mitocondrial, por lo que son necesarios más estudios para confirmar la función reguladora de la enzima.

## INTRODUCCIÓN

El camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* es un crustáceo que en la actualidad tiene una gran importancia en el mercado internacional de alimentos. Su hábitat natural se extiende por las costas americanas del océano Pacífico, desde Sonora en México, hasta Tumbes en Perú, no obstante, su producción no se restringe únicamente a estas zonas, ya que países como Brasil, China, Tailandia, Filipinas, entre otros, han utilizado a la especie para cultivo, convirtiéndose en importantes productores del camarón blanco a nivel mundial (FAO, 2006).

Estudios de la biología básica del camarón blanco han demostrado que el organismo está adaptado a las condiciones cambiantes de oxígeno disuelto en los estuarios y estanques de cultivo que habita. Dentro de sus respuestas biológicas más básicas, los organismos son capaces de movilizarse de áreas con baja concentración de oxígeno (hipóxicas) a aquellas con concentración de oxígeno normal (normoxicas; Dall y col., 1990). A nivel fisiológico y bioquímico existen otras adaptaciones reportadas en esta especie para enfrentar niveles bajos de oxígeno en el ambiente, éstas incluyen un aumento en la síntesis de hemocianina y un aumento en el metabolismo anaeróbico (Racotta y col., 2002).

Además, existe evidencia de que cuando el organismo está expuesto a condiciones de hipoxia existen mecanismos de regulación a nivel transcripcional y traduccional de genes y proteínas involucrados en el metabolismo aeróbico, el cual se lleva a cabo en la mitocondria (Martínez-Cruz y col., 2011; 2012; 2015).

La mitocondria es la planta de energía de las células animales, su función principal es producir energía en forma de ATP, sin embargo, el repertorio de procesos biológicos en los que la mitocondria se ve involucrada no se limita únicamente a la producción de energía, también se puede citar su participación en procesos como la termogénesis (Cannon y Nedergard, 2004), la apoptosis o muerte celular (Galluzzi y col., 2008), la regulación del estado redox celular (Handy y Loscalzo, 2012), entre otros.

La mitocondria, así como también los plástidos, son los únicos organelos que cuentan con un genoma propio, sin embargo, la mayoría de las proteínas mitocondriales se encuentran codificadas en el genoma nuclear (Taanman, 1999). Algunas de estas proteínas pueden cumplir varias funciones, en algunos casos esenciales o reguladoras de la función mitocondrial, tal es el caso de las enzimas isomerasas como la ciclofilina D.

La ciclofilina D (CyP-D) es la isoforma mitocondrial de la familia de las ciclofilinas (Connern y Halestrap, 1992; Nakagawa y col., 2005), está clasificada como una peptidil-prolil cis-trans isomerasa y su actividad enzimática consiste en la catálisis de la interconversión de los isómeros cis/trans en enlaces peptídicos de tipo Xaa-Prolina (donde Xaa representa cualquier aminoácido; Galat, 1993). Además de su papel en la interconversión de isómeros, varios estudios han sugerido que esta proteína juega un papel importante en la transición de la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial y en la muerte celular, sin embargo, aún se desconoce el mecanismo (Lin y Lechleiter, 2002; Basso y col., 2005; Baines y col., 2005; Giorgio y col., 2009; Bernardi, 2013; Halestrap, 2014).

La transición de la permeabilidad mitocondrial es un proceso que consiste en un incremento súbito en la permeabilidad de la membrana interna causada por la elevación del  $\text{Ca}^+$  intramitocondrial y por la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS); lo anterior permite el paso de iones y solutos con una masa de hasta 1500 Da, provocando un aumento en el volumen de la matriz mitocondrial, pérdida del potencial de la membrana interna (despolarización), alteraciones en la síntesis de ATP y difusión de solutos hacia y desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranal (Kim y col., 2003; Basso y col., 2005; Nakagawa y col., 2005; Di Lisa y col., 2011; Bernardi, 2013). El fenómeno de la transición de la permeabilidad y la función de la ciclofilina D también se ha asociado con importantes procesos como la respuesta celular al estrés oxidativo, al daño por isquemia-reperfusión y otras enfermedades (Kim y col., 2003; Baines y col., 2005; Nakagawa y col., 2005; Giorgio y col., 2010; Di Lisa y col., 2011) y la homeostasis de calcio intracelular (Icha y col., 1997).

A la fecha, en los crustáceos aún se desconoce si las mitocondrias tienen la capacidad de entrar en un estado de transición de la permeabilidad. Más aún, a pesar de que la ciclofilina D se ha encontrado en toda clase de organismos, la información disponible acerca de esta proteína en crustáceos es limitada. Hasta el momento no se tienen reportes acerca de la presencia de la ciclofilina D en el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* y su función putativa. Por todo lo anterior, este trabajo tiene como objetivo identificar y caracterizar la secuencia de ADN complementario que codifica a la ciclofilina D mitocondrial y su proteína deducida, además de la identificación de esta proteína en los extractos proteicos de mitocondrias aisladas de los pleópodos del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en condiciones de hipoxia-reoxigenación, para así establecer las bases para estudios posteriores sobre la función de esta enzima en la mitocondria de los crustáceos.

## HIPÓTESIS

El camarón blanco *Litopenaeus vannamei* cuenta con un transcrito que codifica a la ciclofilina D mitocondrial y su expresión es ubicua. La proteína deducida a partir del transcrito cuenta con los dominios conservados que le confieren todas las características de una ciclofilina activa y su concentración varía dependiendo de los niveles ambientales de oxígeno.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Identificar y caracterizar el ADN complementario que codifica a la ciclofilina D e identificar la proteína en las mitocondrias del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en condiciones de hipoxia-reoxigenación.

### **Específicos**

1. Identificar y caracterizar la secuencia completa del ADNc de la ciclofilina D en el camarón blanco.
2. Evaluar la expresión relativa del transcrito de ciclofilina D en diferentes tejidos del camarón.
3. Caracterizar parcialmente la proteína deducida de la ciclofilina D, establecer sus relaciones filogenéticas y obtener un modelo estructural predictivo de la ciclofilina D.
4. Identificar la proteína en extractos proteicos de las mitocondrias aisladas del camarón en condiciones de hipoxia-reoxigenación.

## ANTECEDENTES

### El Camarón Blanco del Pacífico

El camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*; Figura 1) es una especie de importancia en el mercado internacional de alimentos (FAO, 2006). Su clasificación taxonómica lo coloca dentro del Phylum Arthropoda que es el más numeroso del reino animal, dentro del subphylum Crustacea que cuenta con cerca de 17,635 especies (De Grave y col., 2009).

El ciclo de vida del camarón blanco, como el de todos los miembros de la familia Penaeidae, consta de seis estadios: nauplio, protozoea, mysis, post-larva, juvenil y adulto. Dependiendo del estadio en el que está, el organismo migra de un sitio a otro. Los adultos de esta especie viven, se reproducen y desovan en el mar abierto. Después de la eclosión, las larvas viven en mar abierto hasta alcanzar la etapa de post-larvas, que migran a regiones costeras como estuarios, esteros y manglares de baja profundidad. Una vez que alcanzan la etapa adulta, vuelven a mar abierto para repetir una vez más el ciclo de vida (Dall y col., 1990).

*L. vannamei* es una especie de tendencia carnívora, su dieta consiste principalmente en pequeños moluscos y crustáceos, con un aporte mínimo de materia vegetal y detritos del fondo marino, por tanto, la mayor parte de la energía que requiere es proporcionada por la oxidación de aminoácidos (Dall y col., 1990).

En los estuarios, manglares y cuerpos de agua someros como los estanques de cultivo, el camarón blanco se encuentra expuesto a niveles bajos de oxígeno disuelto en el agua (hipoxia), llegando en algunos casos hasta la ausencia total de oxígeno (anoxia), estas dos condiciones pueden deberse a factores y procesos tanto naturales como antropogénicos (Wu, 2002).

Asimismo, a lo largo del ciclo circadiano existen variaciones importantes en la concentración de oxígeno disuelto en el agua marina, desde la normoxia a lo largo del día (7 mg/L), hasta la hipoxia severa o anoxia en el periodo nocturno (1 mg/L) (Puente, 2009).

Se sabe que el camarón blanco posee varias adaptaciones para aumentar su supervivencia frente a condiciones hipóxicas, la más básica de estas es una respuesta conductual con el cambio de posición o desplazamiento del organismo cuando sensa concentraciones de oxígeno por debajo de la normal (Dall y col., 1990).

Otras adaptaciones incluyen un aumento en la síntesis de hemocianina y un aumento en el metabolismo anaeróbico (Racotta y col., 2002).

A nivel molecular hay evidencia de que durante los eventos de hipoxia existen mecanismos de regulación tanto a nivel transcripcional como a nivel traduccional para las proteínas involucradas en el metabolismo aeróbico, el cual se lleva a cabo en la mitocondria (Martínez y col., 2011; 2012; 2015).

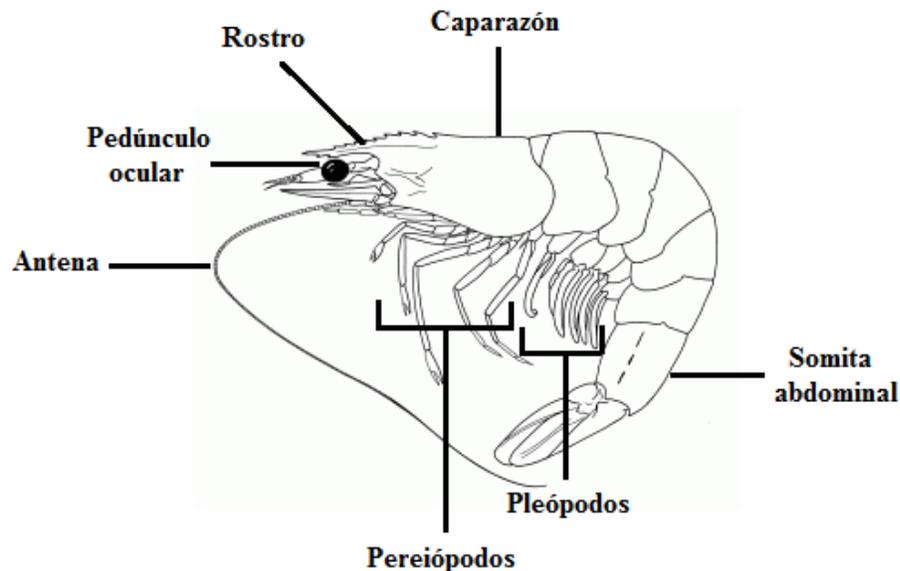


Figura 1. Anatomía básica de *Litopenaeus vannamei*. Adaptada de FAO (2006).

### La Función Mitocondrial

La mitocondria es la planta generadora de energía química por excelencia de las células animales, su función más conocida y estudiada es la de producir energía en forma de ATP, esto a través de una reacción acoplada en donde se genera un gradiente electroquímico de protones producido por la cadena respiratoria que es utilizado por la enzima ATP sintasa para catalizar la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi (Elston y col., 1998; Wang y Oster, 1998).

Este proceso es posible debido a que durante la oxidación de macronutrientes como carbohidratos, lípidos y proteínas se producen las formas reducidas de los acarreadores de electrones nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y flavín adenin dinucleótido (FADH), que son los responsables de transportar los electrones hacia la cadena respiratoria (Ernster y Schatz, 1981; Weiss y col., 1991).

Cabe destacar que la gran mayoría de los procesos de oxidación de macronutrientes, al igual que el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa, se llevan a cabo dentro de la matriz mitocondrial (Ernster y Schatz, 1981).

No obstante su función esencial en la síntesis de ATP, el repertorio de procesos biológicos en los que se ve involucrada la mitocondria no se limita únicamente a la producción de energía, también se puede citar su participación en los procesos de termogénesis (Cannon y Nedeergard, 2004), apoptosis (Galluzzi y col., 2008), regulación del estado redox celular, síntesis de hemoglobina (McKay y col., 1969), homeostasis del Ca<sup>+</sup> intracelular (Gunter y col., 2004), producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Turrens, 2003) y en procesos cancerosos (Kulawiec y col., 2009), entre otros.

Una característica importante de la mitocondria es que cuenta con un genoma propio, en el que se encuentran codificadas 13 proteínas que forman parte de los complejos multiméricos de la cadena respiratoria; sin embargo, la mayoría de las proteínas mitocondriales se encuentran codificadas en el genoma nuclear, son traducidas en los ribosomas citosólicos y posteriormente translocadas a la mitocondria por medio de secuencias de aminoácidos denominadas señalizadoras (Taanman, 1999). Estas proteínas cumplen varias funciones, que muchas veces resultan esenciales para la mitocondria, como es el caso de las enzimas isomerasas como la ciclofilina D, que es una peptidil-prolil cis-trans isomerasa.

### **Enzimas Isomerasas**

Una enzima se define como cualquier biomolécula capaz de actuar como catalizador en una reacción química, pudiendo ser de naturaleza proteica, como la mayoría de las enzimas conocidas, o de naturaleza nucleotídica, como es el caso de los ARN catalíticos, mejor conocidos como ribozimas (Nelson y Cox, 2004).

La gran mayoría de las reacciones bioquímicas llevadas a cabo en los seres vivos son catalizadas con ayuda de enzimas, por lo tanto, su diversidad de funciones biológicas es enorme e imprescindible para la existencia de la vida (Nelson y Cox., 2004). Con base en lo anterior, las enzimas fueron clasificadas por el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-UIBMB) en 6 grandes grupos o clases, según el tipo de reacción química que catalizan: oxidoreductasas (EC 1), transferasas (EC 2), hidrolasas (EC 3), liasas (EC 4), isomerasas (EC 5) y ligasas (EC 6).

Las enzimas isomerasas, objeto de este estudio, son proteínas que se caracterizan por catalizar cambios geométricos o estructurales dentro de una molécula (NC-IUBMB), se encuentran en la mayoría de los organismos y son una clase muy diversa de enzimas.

Las isomerasas pueden cumplir una gran variedad de funciones, que van desde el metabolismo de carbohidratos, catalizando aproximadamente un 4% de las reacciones efectuadas, hasta el metabolismo de terpenoides y policétidos (Martínez y col., 2014). Las isomerasas se han dividido en 6 subclases de enzimas como lo muestra la Figura 2.

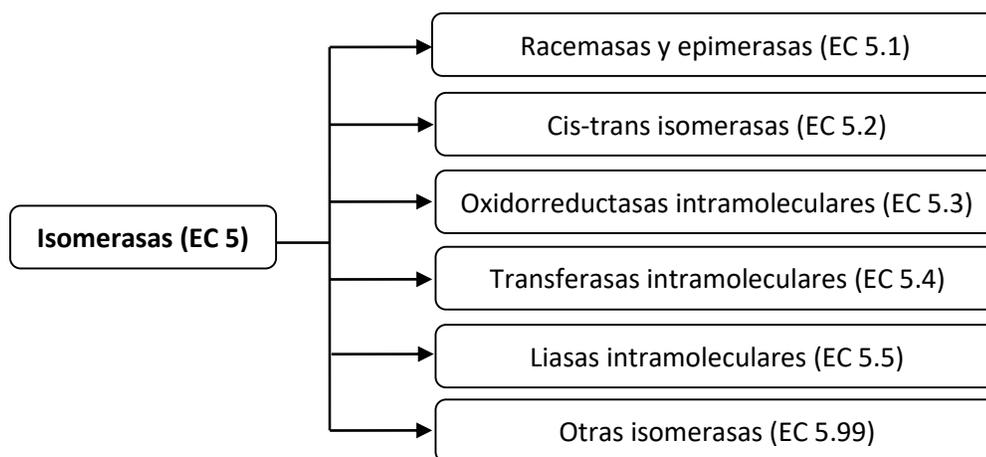


Figura 2. Clasificación de las isomerasas por la NC-UIBMB

### **Peptidil-prolil Cis-trans Isomerasas**

Debido a la naturaleza del enlace peptídico sobre el cual actúan algunas isomerasas, el cual posee un carácter parcial de doble enlace entre el grupo amino y carboxilo que lo forman, este puede adoptar dos configuraciones distintas según el acomodo espacial de los grupos funcionales: cis o trans (Creighton, 1990; Galat y Metcalfe, 1995; Wang y Heitman, 2005).

La gran mayoría de los enlaces peptídicos en las proteínas se encuentran en la configuración trans debido a que el isómero cis genera estructuras con menor estabilidad, causadas por fenómenos de impedimento estérico; sin embargo, en el caso de los enlaces de prolina, la posibilidad de encontrar los isómeros cis y trans es casi la misma (Rostam y col., 2015), esto debido a que su cadena lateral cíclica disminuye el efecto del impedimento estérico (Creighton, 1990), causando que la barrera energética entre una configuración y otra sea muy pequeña, por lo anterior, la interconversión entre los isómeros cis y trans en los enlaces peptídicos que contienen prolina es un paso esencial en el plegamiento de las proteínas (Kumari y col., 2013). Este proceso ocurre naturalmente de manera lenta, convirtiéndose en un paso limitante en la velocidad de plegamiento de las proteínas (Creighton, 1990; Wang y Heitman, 2005).

Así, las peptidil-prolil cis-trans isomerasas son un grupo de enzimas capaces de interconvertir los isómeros cis/trans de los enlaces peptídicos de tipo Xaa-prolina (Figura 3; Kumari y col., 2013).

La primera de estas enzimas en ser descrita fue la ciclofilina A por Fischer y colaboradores en 1984, quienes la aislaron de la corteza del riñón porcino (Galat y Metcalfe, 1995; Wang y Heitman, 2005; Rostam y col., 2015), desde entonces, el número de enzimas descubiertas con actividad peptidil-prolil isomerasa se ha incrementado. Hoy en día se conocen tres divisiones dentro del grupo de las peptidil-prolil cis-trans isomerasas: las ciclofilinas, las proteínas de unión a FK-506 y las parvulinas (Stamnes y col., 1992), todas ellas poseen actividad peptidil-prolil isomerasa, sin embargo, no comparten semejanzas estructurales significativas (Fruman y col., 1994; Galat y Metcalfe, 1995).

Estos tres grupos de enzimas pueden distinguirse entre sí, debido a que cada uno tiene la capacidad de unirse a una sustancia específica diferente: la ciclosporina A se une a las ciclofilinas, el tacrolimus se une a las proteínas de unión a FK-506 (Galat y Metcalfe, 1995) y la juglona se une a las parvulinas (Hennig y col., 1998).

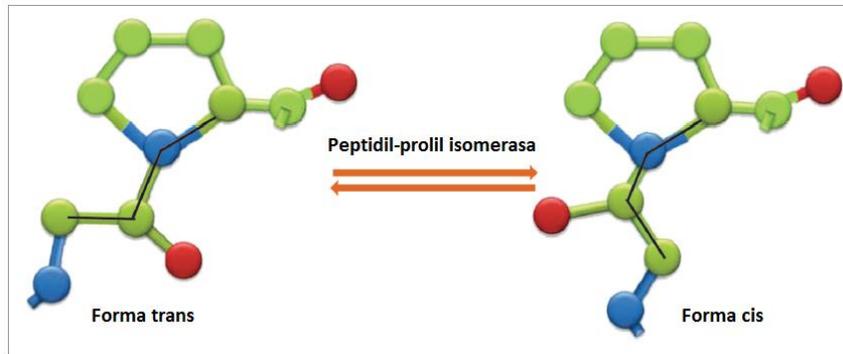


Figura 3. Representación gráfica de la reacción catalizada por las peptidil-prolil isomerasas. Adaptada de Kumari y col. (2013).

### Las Ciclofilinas

Las ciclofilinas (EC 5.2.1.8) son un grupo de enzimas pertenecientes a las peptidil-prolil cis-trans isomerasas que se distinguen por su capacidad de unirse a la ciclosporina A, se encuentran en prácticamente todos los organismos estudiados, tanto procariontas como eucariotas y sus isoformas se pueden encontrar en diferentes compartimientos celulares, como lo son el núcleo, citosol, retículo endoplásmico, mitocondria y hasta en la vía secretora (Price y col., 1994; Kumari y col., 2013).

Todas las ciclofilinas poseen una estructura altamente conservada entre ellas, compartiendo un dominio de 109 aminoácidos que se encuentra delimitado a su vez por dominios únicos para cada isoforma (Krzywicka y col., 2001; Wang y Heitman, 2005).

Las funciones biológicas que se le atribuyen a las ciclofilinas en los organismos son muy variadas, entre ellas se puede mencionar su participación en la movilización y maduración de proteínas, plegamiento de proteínas (Baker y col., 1994 ; Price y col., 1994 ; Kumari y col., 2013), la modulación de la función proteica y la señalización celular (Wang y Heitman, 2005), el procesamiento de ARN (Krzywicka y col., 2001), la apoptosis (Montague y col., 1994), la replicación viral (Kovalev y Nagy, 2013) y la transición de la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial (Lin y Lechleiter, 2002; Basso y col., 2005; Baines y col., 2005; Giorgio y col., 2009; Bernardi, 2013; Halestrap, 2014); sin embargo, los mecanismos detrás de estas funciones atribuidas a las ciclofilinas son aún en su mayoría desconocidos (Kumari y col., 2013).

La ciclofilina D es la isoforma mitocondrial de la familia de las ciclofilinas (Connern y Halestrap, 1992; Nakagawa y col., 2005), esta enzima fue aislada por primera vez de las mitocondrias del hongo *Neurospora crassa* y descrita en 1988 por Tropschug y colaboradores.

Posteriormente fue aislada de las mitocondrias de hígado de rata por Connern y Halestrap en 1992. Desde entonces, se ha sugerido en numerosas ocasiones que esta enzima juega un papel importante en la transición de la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial de diversas especies (Ting y Lechleiter, 2002; Basso y col., 2005; Baines y col., 2005; Giorgio y col., 2009; Bernardi, 2013; Halestrap, 2014).

La información disponible acerca de esta enzima en animales proviene principalmente de los vertebrados. En los invertebrados la información es aún muy escasa. En el caso de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, existen 14 proteínas identificadas que pertenecen a la familia de las ciclofilinas, sin embargo, ninguna de ellas posee una secuencia señal mitocondrial aparente (Azzolin y col., 2010; von Stockum y col., 2011).

Además, en la mayoría de los estudios realizados que involucran a la ciclofilina D, sólo se limitan a identificar a la proteína por medio de su actividad enzimática o mediante técnicas como el *western blot*.

Uno de los escasos estudios existentes fue realizado en el crustáceo *Artemia franciscana* por Menze y colaboradores en 2005, en este estudio se confirmó la presencia de la proteína ciclofilina D por medio de inmunodetección a través de un análisis western blot en proteínas mitocondriales usando anticuerpos policlonales anti-ciclofilina D de conejo (Menze y col., 2005).

### **La Transición de la Permeabilidad Mitocondrial**

En 1976, Hunter y colaboradores observaron por primera vez un fenómeno llamado transición de la permeabilidad mitocondrial (Hunter y col., 1976), el cual consiste en un incremento súbito en la permeabilidad de la membrana interna a iones y solutos con una masa de hasta 1500 Da, provocando un aumento del volumen de la matriz, pérdida del potencial de la membrana interna, alteraciones en la síntesis de ATP, difusión de solutos hacia y desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranal y finalmente la ruptura de la membrana externa mitocondrial (Sung y col., 2003; Basso y col., 2005; Nakagawa y col., 2005; Bernardi, 2013).

Desde el descubrimiento de este fenómeno, los científicos se han dado a la tarea de dilucidar las bases moleculares del funcionamiento de la transición de la permeabilidad mitocondrial, sin embargo, a la fecha éstas son aún objeto de debate (Siemen y Ziemer, 2013; Halestrap, 2014). Inicialmente sólo se sabía que la transición de la permeabilidad era activada por altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intramitocondrial y, a su vez, podía ser inhibida por  $\text{Mg}^{2+}$ , ATP, ADP y ciclosporina A (Haworth y Hunter, 1980; Tanveer y col., 1996; Bernardi, 2013).

Posteriormente se propuso el primer modelo molecular para este proceso (Figura 4), el cual involucra la existencia de un poro inespecífico de un diámetro de alrededor de 2 nm, denominado poro de transición de la permeabilidad (PTP), formado por un complejo heterogéneo de 3 proteínas: el VDAC (canal de aniones dependiente de voltaje), el ANT (translocador de nucleótidos de adenina) y la ciclofilina D (Crompton y col., 1998; Woodfield y col., 1998). Otras fuentes también incluían a otras proteínas como la hexocinasa como componente del poro además de las mencionadas anteriormente (Beutner y col., 1996).

De acuerdo al modelo representado en la figura 4, se sugiere que la ciclofilina D localizada en la matriz mitocondrial, se une a ANT para inducir un cambio conformacional sobre ésta en presencia de altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , provocando la apertura del poro con ayuda de VDAC (Woodfield y col., 1998).

En los años posteriores el modelo sufrió pequeñas modificaciones, permaneciendo la estructura básica intacta, hasta que, en el año 2004, Kokoszka y colaboradores demostraron que la transición de la permeabilidad ocurría aún después de la inactivación por mutación de los genes de las 3 isoformas de ANT en hepatocitos de ratón, concluyendo que ANT no es esencial para el proceso de transición de la permeabilidad (Kokoszka y col., 2004).

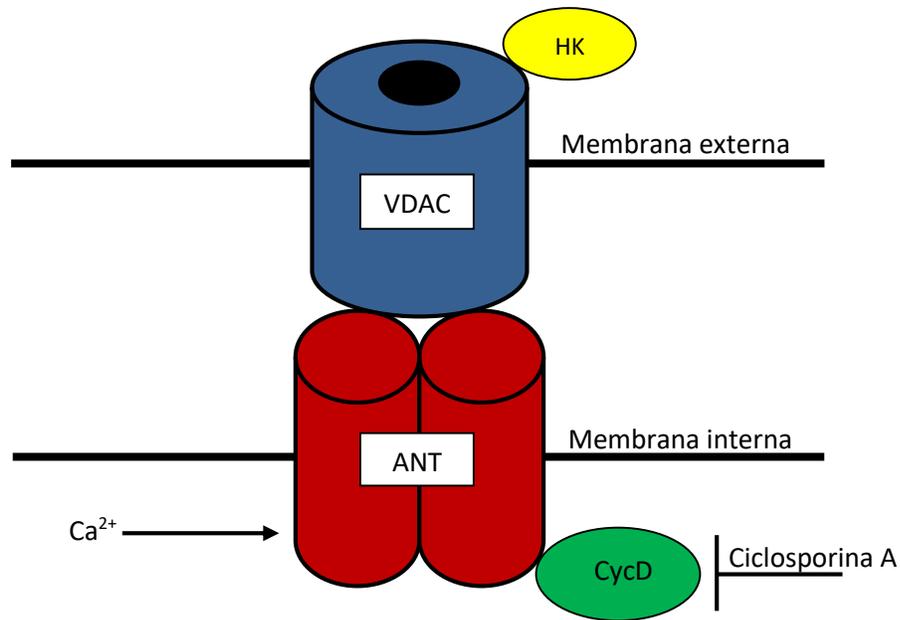


Figura 4. Primer modelo molecular del poro de transición de la permeabilidad, el cual es activado por  $\text{Ca}^{2+}$  e inhibido por ciclosporina A. Incluye a las proteínas básicas VDAC, ANT y ciclofilina D (CycD), y a la hexocinasa (HK), otra proteína sugerida como posible formadora del poro.

Posteriormente se demostraría mediante experimentos similares que VDAC también es prescindible para la transición de la permeabilidad (Krauskopf y col., 2006; Baines y col., 2007). En cuanto a la ciclofilina D, experimentos con ratones carentes de esta enzima demostraron que se necesitaban cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  mayores a las normales para provocar la transición de la permeabilidad, sugiriendo que la ciclofilina D juega un papel importante en la regulación de este proceso (Nakagawa y col., 2005).

En 2013, Giorgio y colaboradores sugirieron un nuevo modelo en el cual el responsable del proceso de transición de la permeabilidad es un poro formado por dímeros de la ATP sintasa (Figura 5). Este modelo es recientemente el más aceptado, está basado en el hallazgo de que la ciclofilina D tiene la capacidad de interactuar con la subunidad OSCP de la ATP sintasa (proteína que confiere susceptibilidad a oligomicina, por sus siglas en inglés) de una manera similar a como lo hace la benzodiazepina 423 (bz-423), una sustancia inhibidora de la actividad de la ATP sintasa (Giorgio y col., 2009). Así, estudios posteriores han demostrado que el sitio de unión de la ciclofilina D a la ATP sintasa es el mismo que el de la bz-423.

En este mismo estudio se reportó que la bz-423 tiene la capacidad de inducir la transición de la permeabilidad, debido a que aumenta la sensibilidad del poro de transición al  $\text{Ca}^{2+}$ ; esto de una manera muy similar a lo que hace la ciclofilina D, reforzando la idea de que el sitio de interacción de la ciclofilina D y la bz-423 con la ATP sintasa es el mismo. Para demostrar lo anterior se adicionó bz-423 a mitocondrias de ratón y bovino en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , los resultados indicaron que la adición de esta sustancia disminuía la cantidad necesaria de  $\text{Ca}^{2+}$  para inducir la transición de la permeabilidad. Por último, en este mismo estudio se detectaron canales activados por  $\text{Ca}^{2+}$  con actividad similar a la transición de la permeabilidad en bicapas fosfolipídicas reconstituidas únicamente con dímeros de la ATP sintasa. Estos resultados demostraron que la interacción entre la ATP sintasa y la ciclofilina D es importante en el proceso de transición de la permeabilidad (Giorgio y col., 2013).

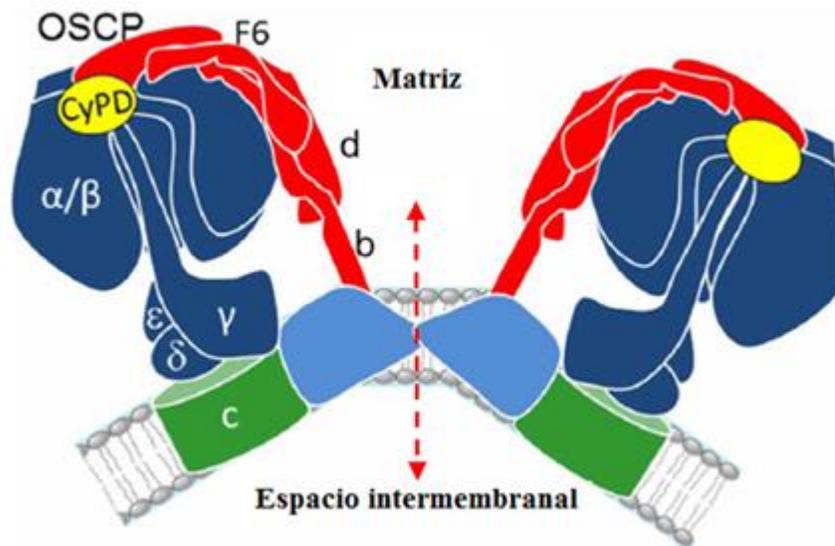


Figura 5. Modelo del poro formado por dímeros de la ATP sintasa. En la imagen se marcan las subunidades del complejo  $\text{F}_0\text{F}_1$ , así como la ciclofilina D (CyPD) unida a la subunidad OSCP. Adaptado de Bernardi (2013).

El último modelo propuesto para el mecanismo de la transición de la permeabilidad fue publicado en 2014 por Halestrap (Figura 6), quien sugiere que la transición de la permeabilidad no es causada por un poro formado por dímeros de ATP sintasa, sino por monómeros de ATP sintasa en conjunto con ANT, el acarreador de fosfatos mitocondrial (PiC) y regulado por la ciclofilina D (Halestrap, 2014).

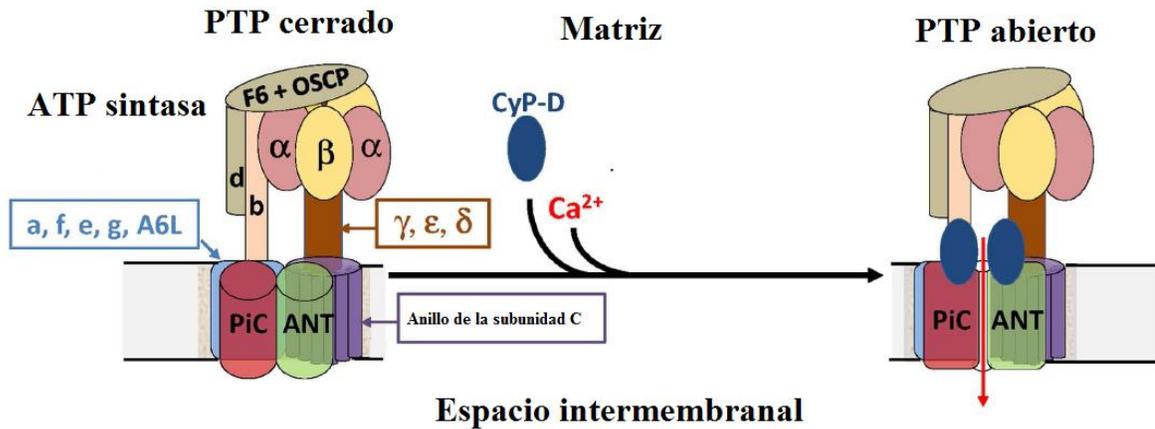


Figura 6. Modelo del poro de transición de la permeabilidad (PTP) formado por el complejo  $F_0F_1$  ATP sintasa, el acarreador de fosfatos (PiC) y el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) que es regulado por la ciclofilina D (CyP-D) y activado por  $Ca^{2+}$ . Adaptado de Halestrap (2014).

Como resultado de lo anterior, cabe destacar que, en todos los modelos propuestos hasta la fecha, la ciclofilina D es la única proteína que se encuentra presente en cada uno y ha sido señalada como parte importante del mecanismo, por lo tanto, se puede sugerir que el estudio de esta proteína será un elemento importante en la investigación acerca del proceso de la transición de la permeabilidad mitocondrial.

## **Procesos Asociados a la Transición de la Permeabilidad de la Membrana Interna Mitocondrial**

En los vertebrados, la transición de la permeabilidad se ha asociado a diferentes procesos, en 1993, Griffiths y Halestrap demostraron que ésta juega un papel importante en la lesión celular causada por eventos de isquemia y reperfusión, observando que en corazones de rata tratados con ciclosporina A (un inhibidor de la transición de la permeabilidad), y sometidos a 30 min de isquemia y 15 min de reperfusión, el ratio ATP/ADP en las mitocondrias regresó a niveles pre-isquémicos. Paralelo a este resultado, también se demostró en otro experimento que la funcionalidad de los corazones no se había perdido del todo (Griffiths y Halestrap, 1993). Estos resultados fueron corroborados en 1997 por Qian y colaboradores, al aumentar el índice de supervivencia de hepatocitos de rata expuestos a isquemia y reperfusión utilizando ciclosporina A (Qian y col., 1997).

En 1998, Ichas y colaboradores sugirieron que la transición de la permeabilidad podría jugar un papel en la modulación de diversos procesos asociados a la homeostasis del calcio celular, al servir como medio para absorber y expulsar calcio en la mitocondria (Ichas y col., 1998).

En el año 2000, Feldmann y colaboradores sugirieron que la transición de la permeabilidad participa en el proceso de apoptosis, al observar que en hepatocitos de ratón estimulados con anticuerpos anti-Fas (Fas es un receptor de la vía extrínseca de la apoptosis), y a su vez tratados con ciclosporina A, se evitaba casi por completo la apoptosis, mientras que las mitocondrias que no fueron tratadas con ciclosporina A sufrieron muerte por apoptosis (Feldmann y col., 2000).

En 2007, Forte y colaboradores descubrieron que en ratones con encefalomiелitis autoinmune experimental carentes del gen de la ciclofilina D se tenía un índice mayor de preservación de axones que en ratones provistos del gen de esta enzima, además, se menciona que una vez los ratones desarrollaron la enfermedad, éstos se recuperaron parcialmente. Los autores concluyeron que la transición de la permeabilidad es un proceso importante en el daño causado a los axones durante enfermedades como la esclerosis múltiple (Forte y col., 2007).

A pesar de los avances logrados en el estudio de los modelos vertebrados, la información disponible acerca de este proceso en invertebrados es limitada, sin embargo, los estudios existentes apuntan a que el proceso de transición de la permeabilidad ocurre de manera distinta a lo reportado en vertebrados. En un estudio realizado en 2005 por Menze y colaboradores en embriones de *Artemia franciscana*, se encontró que a pesar de añadir  $\text{Ca}^{2+}$  a las mitocondrias aisladas hasta alcanzar una concentración de 1 mM no se observa el fenómeno de la transición de la permeabilidad; mientras que en las mitocondrias aisladas de corazón de bovino se reportó que aproximadamente 100  $\mu\text{M}$  es suficiente para activar el proceso. De manera adicional tampoco se observó aumento en el volumen mitocondrial (hinchamiento), ni la liberación de citocromo c al citosol, ambas respuestas comúnmente observadas en presencia de un cambio en la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Así, los autores concluyeron que la ausencia del fenómeno de transición de la permeabilidad mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  en estos organismos puede jugar un papel importante en su habilidad de sobrevivir a periodos sumamente prolongados de anoxia (Menze y col., 2005).

En 2009, Holman y Hand encontraron que en las mitocondrias del camarón fantasma *Lepidophthalmus louisianensis*, la adición de concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  hasta 1 mM tampoco desencadenaba la aparición de ningún signo medible del fenómeno de transición de la permeabilidad. En este mismo estudio se utilizaron como muestra control mitocondrias de *L. louisianensis* a las cuales se le adicionó  $\text{HgCl}_2$ , un inductor artificial de hinchazón mitocondrial.

Después de añadir el  $\text{HgCl}_2$ , observaron un claro incremento en el volumen mitocondrial, lo cual no ocurrió al añadir  $\text{Ca}^{2+}$ . Los autores de este estudio concluyeron que la existencia de un poro de transición de la permeabilidad mitocondrial en *L. louisianensis* regulado por  $\text{Ca}^{2+}$ , como el que se encuentra en mamíferos, es poco probable.

Más tarde, en 2012, Konrad y colaboradores confirmaron la ausencia de un poro de transición regulado por  $\text{Ca}^{2+}$  en las mitocondrias aisladas del camarón del Norte *Crangon crangon* y del langostino de agua dulce *Palaemon serratus* en donde no hubo transición de la permeabilidad aún después de añadir grandes cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$ . Los autores comprobaron esto mediante la visualización de las mitocondrias en microscopio electrónico de transmisión y sugirieron que la presencia de un poro mitocondrial regulado por  $\text{Ca}^{2+}$  sea quizás una característica perdida durante el desarrollo evolutivo de los crustáceos (Konrad y col., 2012).

En 2011, en un estudio realizado por von Stockum y colaboradores en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, se observó el fenómeno de la transición de la permeabilidad mitocondrial, pero este no era inhibido por ciclosporina A, ni por ADP, además, el volumen mitocondrial no aumentaba, ni se liberaba citocromo c al citosol, llegando a la conclusión de que en estos organismos el funcionamiento del proceso de transición de la permeabilidad es distinto al de los mamíferos (von Stockum y col., 2011).

Por todo lo anterior, se hace necesario profundizar en los estudios en crustáceos sobre el fenómeno de la transición de la permeabilidad mitocondrial y las proteínas que en él participan, ya que claramente las respuestas fisiológicas de estos organismos a los cambios en la cantidad de oxígeno disuelto en el agua marina, son diferentes en muchos aspectos a lo que ha sido reportado hasta ahora en vertebrados. A diferencia del estudio de los vertebrados, en los crustáceos aún se carece de los estudios básicos necesarios para responder las preguntas existentes acerca de la transición de la permeabilidad, tales como es la caracterización de las secuencias génicas y de aminoácidos de las proteínas que juegan un papel en la transición de la permeabilidad, como es el caso de la ciclofilina D. Así, el estudio de estas moléculas es de gran relevancia ya que así se hace posible realizar una comparación entre las secuencias de vertebrados e invertebrados, pudiendo así obtener algunas respuestas acerca de qué es lo que hace que el mecanismo de acción de la transición de la permeabilidad sea diferente entre ambos grupos de organismos.

Por lo tanto, este estudio pretende identificar y caracterizar la secuencia del ADNc que codifica para la ciclofilina D en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*; asimismo, se pretende analizar sus relaciones filogenéticas, construir un modelo predictivo *in silico* de su estructura y realizar la inmunodetección de la proteína en fracciones proteicas de mitocondrias aisladas del camarón en diversas condiciones fisiológicas, todo el conocimiento generado será de utilidad para la realización de futuros estudios acerca del proceso de la transición de la permeabilidad mitocondrial en estos organismos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Identificación y Caracterización de la Secuencia Completa de ADNc de la Ciclofilina D en el Camarón Blanco

#### Aislamiento y Extracción de ARN Total del Músculo del Camarón Blanco *Litopenaeus vannamei*

El aislamiento y extracción de ARN total se llevó a cabo utilizando el reactivo Trizol® (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método tiene como base el protocolo desarrollado por Chomczynski y Sacchi en 1987 y consiste en cinco etapas, en la primera etapa se añadió 1 mL de Trizol® a 100 mg de tejido, posteriormente se homogenizó la mezcla mecánicamente o mediante sonicación. En la etapa de separación de fases, se incubó la mezcla homogenizada por 5 min a temperatura ambiente (TA), después se añadieron 200 µL de cloroformo, se mezcló suavemente y se incubó 3 min a TA. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 12000 x g por 15 min a 4°C para recolectar la fase acuosa. En la siguiente etapa, a la fase acuosa se le añadieron 500 µL de isopropanol frío al 100%, después se incubó 10 min a TA y se centrifugó a 12000 x g por 10 min a 4°C.

Una vez hecho esto, se retiró el sobrenadante y se lavó el precipitado de ARN total con 1 mL de etanol frío al 75%, después se centrifugó a 7500 x g por 5 min a 4°C, una vez hecho esto se descartó nuevamente el sobrenadante y se retiró el remanente de etanol. El precipitado de ARN se resuspendió utilizando 30 µL de H<sub>2</sub>O con 0.1% de dietilpircarbonato (DEPC).

#### Cuantificación y Evaluación de la Integridad del ARN Total

El ARN total extraído de cada muestra de tejido fue cuantificado utilizando el espectrofotómetro NanoDrop® 1000 y se utilizó el cociente de absorbancia 260/280 nm para determinar su pureza. Posteriormente se evaluó su integridad mediante la visualización de las bandas correspondientes al ARNr 18S y 28S en un gel de agarosa al 2% teñido con SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen), al cual se le cargaron 2.5 µg de ARN total. La electroforesis se llevó a cabo con una corriente de 60 V durante 90 min en una cámara Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad), con buffer TAE 1X (Tris 40 mM [pH 7.6], ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM) y se visualizó en un fotodocumentador Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad).

## **Eliminación de ADN Genómico Presente en la Muestra de ARN Total**

Para la eliminación del ADN genómico contaminante se utilizó la enzima recombinante DNasa I (Roche) para tratar 6 µg de ARN total según las instrucciones del fabricante. A 5 µg de muestra se les agregó 1 µL de buffer de incubación 10X y 0.25 µL de desoxirribonucleasa, posteriormente la mezcla se aforó a 10 µL con H<sub>2</sub>O 0.1% DEPC, después se incubó a 35°C por 20 min. Por último, se incubó a 75°C por 10 min para inactivar a la enzima.

Para asegurar que la eliminación del ADNg se llevó a cabo adecuadamente, el ARN tratado con DNasa I se utilizó como templado para una reacción de PCR utilizando oligonucleótidos específicos para el gen de la proteína tripsina del camarón blanco. Las reacciones se llevaron a cabo usando 12.5 µL de Taq PCR Master Mix (QIAGEN), 1 µL de oligonucleótido sentido (20 µM), 1 µL de oligonucleótido antisentido (20 µM), 600 ng de ARN y el volumen final se llevó a 25 µL con H<sub>2</sub>O Milli-Q®. Como control positivo se utilizó una reacción que contenía como templado ADNg de camarón (previamente aislado) con oligonucleótidos específicos para la proteína tripsina. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94°C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min y 72°C por 1 min, y por último 72°C por 10 min durante la fase de extensión. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen). La electroforesis se llevó a cabo a un potencial de 70 voltios por 60 min.

## **Síntesis de ADN Complementario y Diseño de Oligonucleótidos Específicos**

Para la síntesis del ADN (ADNc) complementario se utilizó el kit SuperScript® II First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, a 5 µg de ARN total libre de ADNg se le añadió 1 µL de Oligo(dT)<sub>12-18</sub>, 1 µL de una mezcla de dNTPs (10 mM) y se llevó el volumen a 10 µL con H<sub>2</sub>O DEPC; la mezcla se incubó a 65°C por 5 min seguido de 1 min en hielo. A esta mezcla se le añadieron 2 µL de RT buffer 10X, 4 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2 µL de DTT (0.1 M) y 1 µL de RNaseOUT® (40 U/µL). Después la mezcla se incubó a 42°C por 2 min y se añadió 1 µL de SuperScript® II RT, la reacción se incubó a 42°C por 50 min y a 70°C por 15 min. Por último, se añadió 1 µL de RNasa H y se incubó la mezcla a 37°C por 20 min.

El ADNc sintetizado a partir del músculo del camarón fue utilizado como templado para la amplificación de fragmentos de doble cadena por PCR usando oligonucleótidos específicos que fueron diseñados utilizando el programa OligoEvaluator™ (sitio web: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/oligo-evaluator.html>). El diseño de los oligonucleótidos se basó en secuencias parciales de genes expresados (ESTs por sus siglas en inglés) y contigs de *L. vannamei* obtenidos de la base de datos GenBank.

### **Amplificación y Secuenciación del ADNc de la Ciclofilina D**

Para la amplificación de la secuencia nucleotídica de la ciclofilina D se hicieron reacciones de PCR utilizando 12.5 µL de Taq PCR Master Mix (QIAGEN), 1 µL de oligonucleótido sentido (20 µM), 1 µL de oligonucleótido antisentido 20 µM, 250 ng de ADNc y el volumen final se llevó a 25 µL con H<sub>2</sub>O Milli-Q®. Se utilizó como control positivo una reacción que contenía como templado ADNg de camarón con oligonucleótidos específicos para la proteína tripsina. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94°C por 1 min, seguido de 32 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min y 72°C por 1 min, y por último 72°C por 10 min.

El extremo 3' de la secuencia nucleotídica fue obtenido mediante el uso de la técnica de amplificación rápida de los extremos de ADNc (RACE, por sus siglas en inglés). Esta técnica consistió en la síntesis de ADNc a partir de ARN libre de ADNg usando el kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) con las siguientes modificaciones a las instrucciones del fabricante: en la primera reacción se utilizaron 1000 ng de RNA libre de ADNg y 1 µL del oligonucleótido antisentido CDSIII/3'PCR (5'-ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-d(T)<sub>30</sub>N<sub>-1</sub>N-3'; N = A, G, C, o T; N<sub>-1</sub> = A, G o C [12µM]) del kit SMART® cDNA Library Construction (Clontech Laboratories) en lugar de oligo(dT)<sub>12-18</sub>.

Posteriormente, se realizó una PCR convencional empleando un oligonucleótido específico (sentido) de la secuencia de ciclofilina D y el oligonucleótido CDSIII/3'PCR como reverso. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95°C por 20 s, seguido de 25 ciclos de 95°C por 15 s y 68°C por 6 min.

Una vez amplificada la secuencia se procedió a purificar los productos de PCR utilizando el kit NucleoSpin® Extract II (Clontech Laboratories) y se secuenciaron utilizando el servicio de secuenciación del Laboratorio de Evolución Molecular y Sistemática de la Universidad de Arizona.

Los alineamientos de las secuencias nucleotídicas se hicieron utilizando el algoritmo ClustalΩ (Söding, 2005) (sitio web: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

### **Expresión Relativa del Transcrito de Ciclofilina D en Diferentes Tejidos del Camarón**

Para medir la expresión relativa de la ciclofilina D en diferentes tejidos del camarón se extrajo ARN total y se sintetizó ADNc de los siguientes tejidos: músculo, pleópodos, hepatopáncreas, pedúnculo ocular y cordón nervioso, utilizando la metodología descrita en apartados anteriores. Posteriormente se hicieron reacciones de PCR para cada uno de los tejidos conteniendo 12.5 µL de Taq PCR Master Mix (QIAGEN), 1 µL de oligonucleótido sentido (20 µM), 1 µL de oligonucleótido antisentido (20 µM), 250 ng de ADNc y el volumen se llevó a 25 µL con H<sub>2</sub>O Milli-Q® en un termociclador DNA Engine® (Bio-Rad). Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 94°C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min y 72°C por 1 min, y por último una fase de extensión a 72°C por 10 min.

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen). La expresión relativa fue calculada semicuantitativamente por medio del software ImageJ, con base a la comparación de la intensidad de las bandas de las reacciones de amplificación de ciclofilina D utilizando a la banda correspondiente a la expresión del transcrito en branquias como referencia.

### **Análisis Filogenético y Modelación *in silico* de la Estructura de la Ciclofilina D del Camarón Blanco**

#### **Análisis de las Relaciones Filogenéticas de la Proteína Deducida**

Se obtuvo la proteína deducida utilizando las herramientas del sitio web ExPASy (sitio web: <http://web.expasy.org/translate/>) para la conversión de la secuencia nucleotídica obtenida a una secuencia de aminoácidos.

Utilizando la secuencia de la proteína deducida, se armó un árbol filogenético usando secuencias de proteínas homólogas de otros organismos depositadas en la base de datos GenBank. Los alineamientos múltiples se realizaron utilizando el algoritmo ClustalΩ (Söding, 2005) y para el árbol filogenético se usó el programa MEGA 6.0 (Tamura y col., 2013).

## **Obtención del Modelo Estructural Predictivo de la Ciclofilina D**

La estructura predictiva de la ciclofilina D del camarón se obtuvo por modelación molecular utilizando el software Phyre2 (Kelley y col., 2015), usando como templatado la ciclofilina D humana (PDB: 2Z6W) de la cual su estructura ya ha sido caracterizada experimentalmente. La estructura templatado fue seleccionada de la base de datos del PDB (Banco de Datos de Proteínas, por sus siglas en inglés) utilizando el algoritmo BLASTp.

## **Identificación de la Proteína en Extractos Proteicos de las Mitocondrias Aisladas del Camarón**

### **Bioensayo**

Las mitocondrias utilizadas para el ensayo de inmunodetección se obtuvieron en el Laboratorio de Bioenergética y Genética Molecular del CIAD a partir de un bioensayo realizado en Octubre del 2015. Brevemente, las condiciones de dicho bioensayo fueron las siguientes: un total de 50 camarones adultos (*L. vannamei*) con un peso de  $10 \pm 2$  g fueron distribuidos al azar en 2 tanques de plástico que se llenaron con 76 L de agua de mar (n=25). Los camarones se aclimataron por un período de 15 días en condiciones controladas de laboratorio: 28 °C, 35 ppm de salinidad y una concentración de oxígeno disuelto en el agua de 5 mg/L.

Después de la aclimatación, se muestrearon 5 camarones del tanque en normoxia (5.0 mg/L) como controles y subsecuentemente el otro tanque fue expuesto a hipoxia-reoxigenación. Las condiciones hipóxicas se establecieron en el tanque experimental cubriéndolo con una cubierta plástica y se burbujeó progresivamente gas nitrógeno (99% de pureza) para desplazar al oxígeno.

La concentración de oxígeno en el agua se monitoreó constantemente usando un oxímetro digital sumergible modelo YSI 550A (YSI Environmental, USA) y fue cuidadosamente controlada a lo largo del bioensayo.

La fase de hipoxia (1.5 mg/L) duró 12 h continuas y se muestrearon 5 organismos a las 6 y 12 h de esta condición. Posteriormente, el tanque experimental fue reoxigenado retirando la cubierta plástica y el gas nitrógeno, y se colocaron piedras aireadoras. La fase de reoxigenación (5.0 mg/L) duró 12 h continuas y se muestrearon 5 organismos a las 6 y 12 h de esta condición incluyendo el control, obteniéndose un total de 45 muestras individuales.

Posteriormente, los camarones fueron sacrificados por frío y se disectaron los pleópodos de cada organismo. Se obtuvo un pool de tejido de cada condición experimental y se cortó en trozos pequeños con tijeras, fue pesado y posteriormente se adicionaron 2 mL de buffer de extracción A (sacarosa 300 mM, KCl 150 mM, HEPES 20 mM, EGTA 1 mM, pH 7.5, adicionado con PMSF 1 mM). El tejido fue homogenizado usando un homogenizador Dounce, adicionando buffer A (1/5 partes de volumen) y una pequeña porción del tejido para proceder a homogenizar a velocidad media a alta. Este procedimiento se repitió hasta homogenizar todo el tejido.

#### **Extracción de Mitocondrias del Camarón Blanco *Litopenaeus vannamei***

El aislamiento de mitocondrias se llevó a cabo a partir de los pleópodos del camarón disectados y colocados en buffer de extracción A. El homogenizado se centrifugó a 5000 rpm por 10 s a 4°C y se recuperó el sobrenadante; una segunda centrifugación se llevó a cabo a 12,000 rpm por 15 min a 4°C, descartándose el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en buffer de extracción B (sacarosa 300 mM, KCl, 150 mM, EGTA 0.025 mM, hepes 20 mM. pH 7.5) y se centrifugó nuevamente a 3000 rpm por 5 min a 4°C. El sobrenadante se recolectó, se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4°C y se descartó, mientras que el precipitado se resuspendió en buffer de extracción B, todo el proceso se llevó a cabo a 4°C.

Las mitocondrias aisladas se solubilizaron agregando a la muestra lauril-maltósido al 10% y mezclando por agitación durante 10 min a 4°C. Posteriormente se centrifugó la muestra a 14,000 rpm por 30 min a 4°C, el sobrenadante se recuperó y se almacenó a -20°C hasta su uso. Para cuantificar la proteína soluble se utilizó el método de Bradford (1976).

## **Inmunodetección de la Ciclofilina D en Extractos Proteicos Mitocondriales**

Para la inmunodetección de la ciclofilina D en las mitocondrias previamente aisladas, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) al 15%. El buffer de cátodo y ánodo contenían Tris 25 mM, glicina 250 mM (pH 8.3) y SDS al 0.1%.

Se cargaron al gel 50 µg de proteína mitocondrial solubilizadas con lauril-maltósido al 10%. Una vez hecha la electroforesis se hizo la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa y la membrana se bloqueó con una solución de leche en polvo libre de grasa al 3% por toda la noche. Una vez bloqueada la membrana, ésta se incubó con un anticuerpo Ig-G policlonal de cabra anti-ciclofilina D humana (Santa Cruz Biotechnology) durante 2 h. Después la membrana se incubó con un anticuerpo policlonal anti-IgG de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (BioRad) por 1 h y se reveló con un buffer compuesto por 3,3-diaminobencidina al 0.07% y peróxido de hidrógeno al 0.08% (Mahmood y Yang, 2012).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Identificación y Caracterización de la Secuencia Completa del ADNc de la Ciclofilina D en el Camarón Blanco

Se extrajo el ARN total de los diferentes tejidos del camarón. y se confirmó su integridad en cada una de las muestras mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 7a). Posteriormente se eliminó el ADNg de las muestras, el resultado se confirmó mediante PCR seguido de electroforesis en gel de agarosa (Figura 7b).

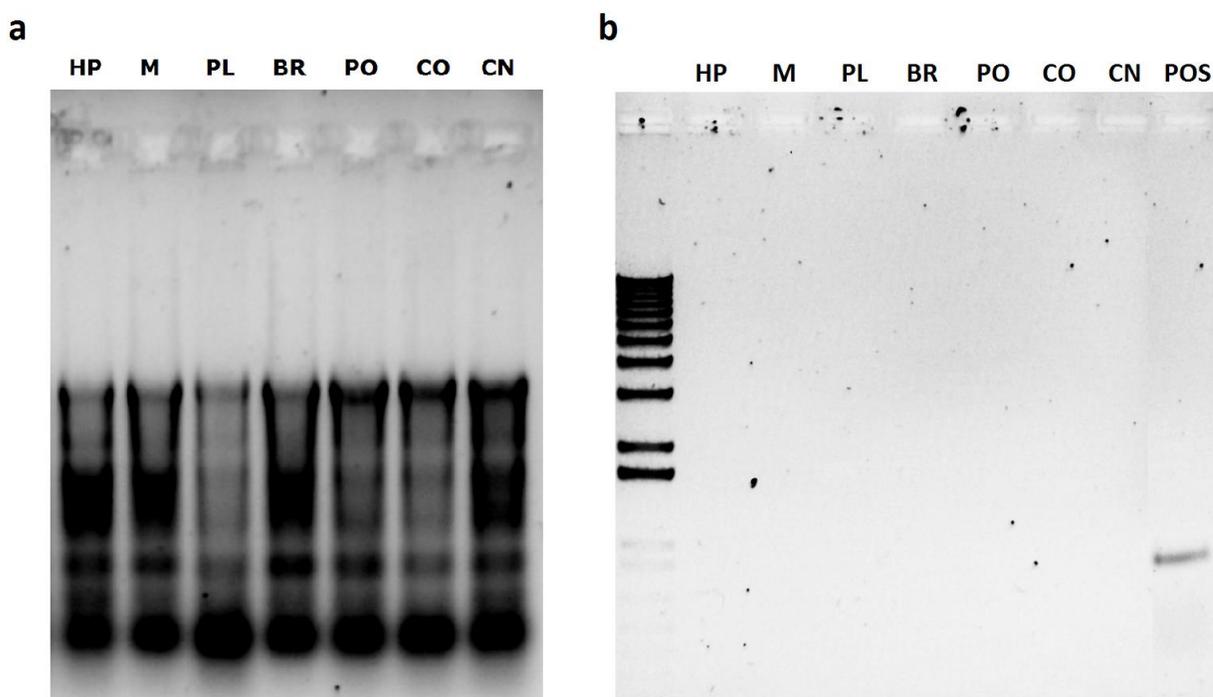


Figura 7. Integridad y eliminación de ADNg contaminante de las muestras de ARN total. **(a)** Gel de integridad, se observan bandas definidas correspondientes al ARN ribosomal (18S y 28S) de cada una de las muestras. **(b)** Gel de eliminación de ADNg, no se observó la amplificación por PCR de ningún fragmento con ADNg como templado, excepto el control positivo. HP: hepatopáncreas, M: músculo, PL: pleópodos, BR: branquias, PO: pedúnculo ocular, CO: corazón, CN: cordón nervioso, POS: positivo.

Se encontraron varios ESTs de *L. vannamei* en la base de datos GenBank cuya proteína deducida posee los dominios conservados de una ciclofilina. A partir de un alineamiento múltiple se creó una secuencia consenso y se diseñaron los siguientes oligonucleótidos específicos:

**Tabla 1.** Oligonucleótidos específicos diseñados para la amplificación de la secuencia de la ciclofilina D del camarón blanco.

<b>Nombre del oligonucleótido</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>	<b>Posición del oligonucleótido</b>
CYCFW1	CCGCAATTATGTTTCGTTTC	-7 – 11
CYCFW2	CAATTTTAATGGAACAGGTGG	291 – 311
CYCFW3	CATCACGACAGTAACTACCCC	426 – 446
CYCRV1	TTACTACTCATTCTCCCTTCAAC	597 – 576
CYCRV2	CCACCTGTTCCATTAATAATTG	311 – 291

El transcrito de la ciclofilina D del camarón blanco consta de 774 pb, en donde el codón de inicio se encuentra la posición 1 y el codón de término se encuentra en la posición 589. Por su parte, la región 3' UTR se encuentra entre las posiciones 592 y 774, la señal de poliadenilación se ubicó entre los nucleótidos 648 y 653 y la cola poli(A) empieza a partir del nucleótido 775.

Por otro lado, la proteína deducida es de 196 aminoácidos. El péptido señal consta de 29 aminoácidos y la proteína madura posee un peso estimado de 18 kDa y una secuencia de 167 aminoácidos. El dominio conservado que corresponde a las ciclofilinas está entre la Pro33 y la Cys190, mientras que el sitio activo está conformado por los residuos His83, Arg84, Phe89, Gln140, Phe142 y Trp150 (Figura 8).

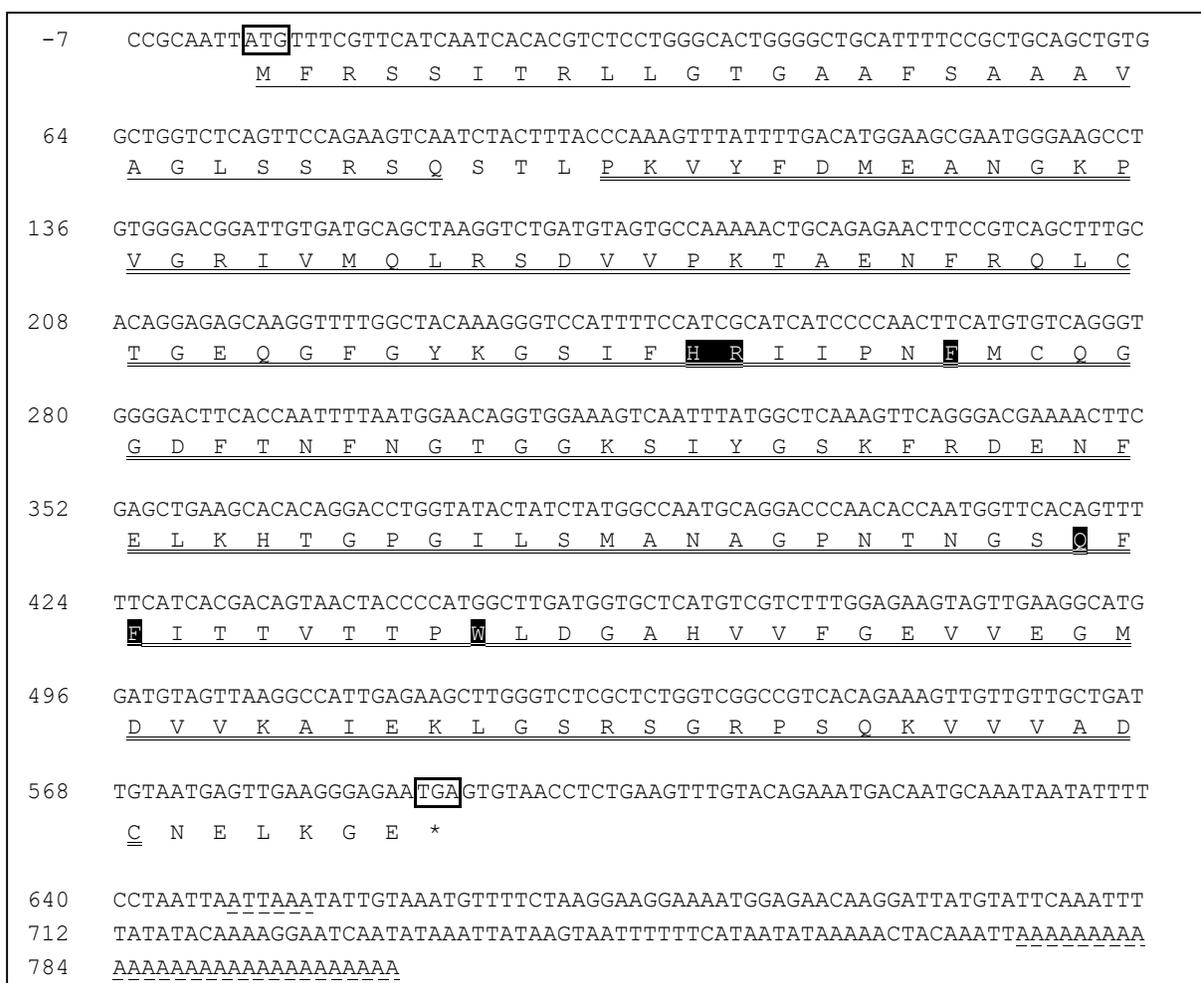


Figura 8. Secuencia nucleotídica y proteína deducida de la ciclofilina D del camarón blanco *L. vannamei*. Los codones de inicio y de término se encuentran enmarcados, el péptido señal se encuentra subrayado simple y el dominio de ciclofilina se encuentra subrayado doble. Los aminoácidos que forman el sitio activo de la enzima se encuentran marcados en negro. La señal de poliadenilación y la cola poli(A) se encuentran subrayados con guiones.

## Evaluación de la Expresión Relativa del Transcrito de Ciclofilina D en Diferentes Tejidos del Camarón

Se sabe que las ciclofilinas se encuentran presentes en todos los organismos estudiados, sin embargo, a la fecha no existen estudios acerca de la expresión del transcrito de la ciclofilina D en diferentes tejidos en ningún organismo. En el presente estudio se confirma que el transcrito de la enzima se expresa de manera ubicua en todos los tejidos del camarón que fueron analizados, incluyendo: hepatopáncreas, músculo, pleópodos, branquias, pedúnculo ocular, corazón y cordón nervioso (Figura 9). Además, esto sugiere que en el camarón no existen isoformas o variantes del transcrito de esta proteína detectadas en los diferentes tejidos evaluados, como sucede en el hongo *Neurospora crassa* (Tropschug y col., 1988).

El análisis semicuantitativo de expresión mostró que tomando como referencia la intensidad de la banda correspondiente a branquias, a la cual se le asignó un valor de intensidad igual a 1, el transcrito de ciclofilina D se expresa 0.24 veces en hepatopáncreas, 0.49 veces en músculo, 1.03 veces en pleópodos, 0.25 veces en pedúnculo ocular, 0.66 en corazón y 0.09 en cordón nervioso.

En orden descendiente, la expresión por tejido de la ciclofilina D mitocondrial es el siguiente: Pl>Br>Co>M>PO>HP>CN. Los resultados muestran que en los órganos en donde se expresa más el transcrito es en branquias y en pleópodos, esto pudiera estar relacionado directamente con la cantidad de mitocondrias presentes en ellos, ya que se sabe que en estos órganos se requiere una alta producción y consumo de energía en forma de ATP (Chimeo y col., 2015).

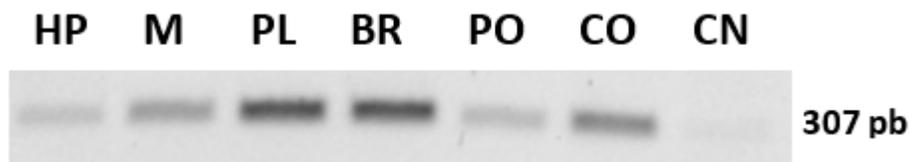


Figura 9. Expresión del transcrito de ciclofilina D en hepatopáncreas (HP), músculo (M), pleópodos (PL), branquias (BR), pedúnculo ocular (PO), corazón (CO) y cordón nervioso (CN) del camarón blanco.

## Caracterización Parcial de la Proteína Deducida de la Ciclofilina D: sus Relaciones Filogenéticas y su Modelo Estructural Predictivo

Se realizaron una búsqueda de secuencias de ciclofilina D de varias especies de organismos (Tabla 2) y un análisis del alineamiento múltiple. Los resultados muestran que la proteína deducida de la ciclofilina D del camarón blanco comparte un alto porcentaje de identidad (más del 60%) con las ciclofilinas mitocondriales de todos los organismos incluidos en el alineamiento, con excepción del protozooario *Blastocystis homininis*, lo cual se explica dada la lejanía evolutiva entre ambas especies (Tabla 2).

**Tabla 2.** Secuencias de ciclofilina D utilizadas para el análisis filogenético y porcentajes de identidad con la secuencia del camarón blanco.

GenBank ID	Especie	Nombre común o taxón	Identidad con la secuencia del camarón
XP_012894512.1	<i>Blastocystis homininis</i>	Protozooario	58%
3R49_A	<i>Homo Sapiens</i>	Humano	75%
NP_758443.1	<i>Rattus norvegicus</i>	Rata	68%
NP_001001597.1	<i>Bos Taurus</i>	Toro	75%
KFO36235.1	<i>Fukomys damarensis</i>	Rata topo	76%
NP_001026397.1	<i>Gallus gallus</i>	Gallo	68%
NP_001244046.1	<i>Xenopus laevis</i>	Rana africana	67%
NP_001040172.1	<i>Bombyx mori</i>	Gusano de seda	71%
BAN20139.1	<i>Riptortus pedestris</i>	Insecto	76%
AGM32516.1	<i>Coptotermes formosanus</i>	Termita de Formosa	78%
KPJ08707.1	<i>Papilio machaon</i>	Mariposa macaón	73%
KDR15281.1	<i>Zootermopsis nevadensis</i>	Insecto	71%
JAP82262.1	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	Garrapata marrón	77%
XP_018018899.1	<i>Hyaella azteca</i>	Crustáceo	78%

En el alineamiento múltiple se puede observar que las secuencias de las ciclofilinas se encuentran muy conservadas en su estructura primaria, incluso entre especies de animales evolutivamente distantes, como es el caso del humano y los insectos como *C. formosanus*. Más aún, todos los aminoácidos que forman parte del sitio activo, así como aquellos que interactúan en la unión con la ciclosporina A (Kajitani y col., 2007) están perfectamente conservados en todas las especies utilizadas para el análisis (Figura 10), lo cual sugiere que la función que cumplen estas proteínas en la mitocondria es necesaria y posiblemente esencial para cada una de las especies (Lee y Kim, 2010).

```

H. azteca      MWSKTVTTAPAAKMLLRNIPFLKLCGAAGGMTAGISFSMFHFSTSAASRSDYVPKVYFD 60
X. laevis     -----MLSAASR-----VVLRCRIVTGPSY--FVASRANSWGSHTKPNMVMYMD 44
L. vannamei  -----MFRSSITRLLGTGAAFS-AAAVAGLS--SRSQSTLPKVVYFD 38
Z. nevadensis -----MAHAALCVYRQSSWSSSL-LGVGIGRGLQ-ASLFVAGVRTLSTKMCLPRVYFD 51
F. damarensis -----MGTQ 4
G. gallus     -----MLVLSAARRLLRPHGELL-----PPGLACV-RAAGARGCSSDAGFRNPLVYLD 48
B. taurus     -----MMLALRCGPRLGLLSGPRSAHLRLPAVR-VCSSGSGSHGSSSSGNPLVYLD 52
H. sapiens    -----MSGNPLVYLD 10
R. norvegicus -----MLALRCGPRLGLLSGPRSAPELLSTT--RTCSDDGGARGANSSSNPLVYLD 50
C. formosanus -----MARVAALHVYRQSLSCPSLHRVGVCGVRESLVCVTVCNFSS----KMSRPKVYFD 51
R. appendiculatus -----MAHVRVAISRFFCPK---AGILKPLIPLSCLFATAAG---KMGLPKVFFE 45
R. pedestris  -----MSFIAFSLCRHT---RSLYSFSPISRVDLSLHCRPLTASKFSTKMSALPRVYFD 52
B. mori       -----M---KIPIMIPVSMRLRRTL VNGTI YSAAALRFASFQPKQVYFD 41
P. machaon    -----MALSSIIRRTFINGALYSAAALRFASFQEKVYFD 36
  
```

```

H. azteca      IAANDKPLGRI I IELRNDVVPKTAENFRQLCTGEQGFYKGSIFHRIIPDFMCOGGDFTR 120
X. laevis     LVADNQPLGRVTFELRADVVPKTADNFRALCTGEKGFYKGSIFHRIIPDFMCOGGDFTN 104
L. vannamei  MEANGKPVGRIVMQLRSDDVPKTAENFRQLCTGEQGFYKGSIFHRIIPDFMCOGGDFTN 98
Z. nevadensis MNADGQRVGRIVMELRNDVVPKTAENFRALCTGEKGFYKGSIFHRIIPDFMCOGGDFTN 111
F. damarensis DQQLPDDGGAAVEVLKADVVPKTAENFRALCTGEKGFYKGSIFHRIIPDFMCOGGDFTN 64
G. gallus     VGADNQPLGRVVLELKADVVPKTAENFRALCTGEKGFYKGSIFHRIIPDFMCOGGDFTN 108
B. taurus     VGADGQPLGRVVLELKADVVPKTAENFRALCTGEKGFYKGSIFHRIIPDFMCOGGDFTN 112
H. sapiens    VDANGKPLGRVVLELKADVVPKTAENFRALCTGEKGFYKGSIFHRIIPDFMCOGGDFTN 70
R. norvegicus VGADGQPLGRVVLELKADVVPKTAENFRALCTGEKGFYKGSIFHRIIPDFMCOGGDFTN 110
C. formosanus MSADNQPVGRIVMELRNDVVPKTAENFRALCTGEKGFYKGSIFHRIIPDFMCOGGDFTN 111
R. appendiculatus VTANGEPLGRIVIELRSDVVPKTAENFRALCTGEKGFYKGSIFHRIIPDFMCOGGDFTN 105
R. pedestris  MEVDGQPAGRI IMELRSDVVPRTAENFRALCTGEKGFYKGSIFHRIIPDFMCOGGDFTR 112
B. mori       VTADGEPLGRIVIKLNTDEVPKTAENFRALCTGEKGFYKGSIFHRIIPDFMCOGGDFTN 101
P. machaon    VTADGEPLGRIVMKNLNADEVPKTAENFRALCTGEKGFYKGSIFHRIIPDFMCOGGDFTN 96
  
```

```

H. azteca      GNGTGKSIYGEKFPDENFKLRHDPGLLSMANAGPNTNGSCFFITTVPCDWLNNKHVVVF 180
X. laevis     HNGTGKSIYGSRFPDENFKLHTGPGILSMANAGPNTNGSCFFIVCTVETWLDNKHVVVF 164
L. vannamei  FNNGTGKSIYGSKFRDENFKLHTGPGILSMANAGPNTNGSCFFITTVTTPWLDGAHVVF 158
Z. nevadensis HNGTGKSIYGSKFEDENFQLKHTGPGILSMANAGPNTNGSCFFIVTTAKTSWLDNRHVVF 171
F. damarensis HNGTGKSIYGSRFPDENFKLHEGPGVLSMANAGPNTNGSCFFICTIKTDWLDGKHVVVF 124
G. gallus     HNGTGKSIYGSRFPDENFKLHEGPGVLSMANAGPNTNGSCFFICTAKTDWLDGKHVVVF 168
B. taurus     HNGTGKSIYGSRFPDENFKLHEGPGVLSMANAGPNTNGSCFFICTIKTDWLDGKHVVVF 172
H. sapiens    HNGTGKSIYGSRFPDENFKLVHGPVLSMANAGPNTNGSCFFICTIKTDWLDGKHVVVF 130
R. norvegicus HNGTGKSIYGSRFPDENFKLVHGPVLSMANAGPNTNGSCFFICTIKTDWLDGKHVVVF 170
C. formosanus HNGTGKSIYGNKFEDENFKLHTGPGILSMANAGPNTNGSCFFITTTAKTSWLDNRHVVF 171
R. appendiculatus HNGTGKSIYGEKFPDENFKLHSGPGILSMANAGPNTNGSCFFILTTRVTPWLDGKHVVVF 165
R. pedestris  HNGTGKSIYGNKFEDENFKLHTGPGILSMANAGPNTNGSCFFVTTVKTWLDNRHVVF 172
B. mori       HNGTGKSIYGRFSDENFKLHTGPGILSMANAGPNTNGSCFFITTVPTWLDNRHVVF 161
P. machaon    HNGTGKSIYGRTFDENFKLRHTGPGILSMANAGPNTNGSCFFITTVATWLDNRHVVF 156
  
```

<i>H. azteca</i>	GRVLEGMEVVKAMEKLGSRSGKPSQKVIITDCNELKEE	218
<i>X. laevis</i>	GCIKDGVDVVKKIEGFGSKTGRPTKKVIVIAECGELS--	200
<b><i>L. vannamei</i></b>	GEVVEGMDVVKAIKELGSRSGRPSQKVVVADCNELKGE	196
<i>Z. nevadensis</i>	GSVVEGMDVVKKLESLSQSGKTSKKITVVDGQQL---	206
<i>F. damarensis</i>	GHVKEGMEVVKKIESFGSKSGKTSKKIVITDCGQLS--	160
<i>G. gallus</i>	GHVKEGMDVVKKIESFGSKNGKTSKKIVITDCGQLS--	204
<i>B. taurus</i>	GHVKEGMDVVKKIESFGSKSGKTSKKDRHHKTAGQLS-	209
<i>H. sapiens</i>	GHVIEGMDVVKKIESFGSKSGRTSKKIVITDCGQLS--	166
<i>R. norvegicus</i>	GHVKEGMDVVKKIESFGSKSGKTSKKIVITDCGQLS--	206
<i>C. formosanus</i>	GSVVEGMDVVKKLESLSQSGKTSKKITVVDGQQL---	206
<i>R. appendiculatus</i>	GSVVEGMEVVKMENLGTQSGKTSKKLVIQSCGQLC--	201
<i>R. pedestris</i>	GAVVEGMDVVKKLESYGSQSGKTSKITVVDGQQLS--	208
<i>B. mori</i>	GSVVEGMDVVQKMEKLGSKSGKPIKKVVISDSGELD--	197
<i>P. machaon</i>	GSVVEGMDVVKMENLGSRNTPSKKVVIAECGELD--	192
	* * * * *	

Figura 10. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la ciclofilina D en diversas especies. En negro se muestran los residuos que conforman el sitio activo, mientras que en gris se muestran los que forman el sitio de unión a ciclosporina A. Los residuos marcados en la parte superior con (\*) forman parte tanto del sitio activo como del sitio de unión a ciclosporina A.

El cladograma resultante muestra en clados diferentes a los animales vertebrados e invertebrados y, además, separa a especies más primitivas como los protozoarios que enraízan el árbol. Dentro del clado que agrupa a los invertebrados, Phylum Arthropoda, se observa una separación en tres diferentes subclados: los crustáceos (*L. vannamei* y *H. azteca*), los lepidópteros (*B. mori* y *P. machaon*) y los isópteros (*C. formosanus* y *Z. nevadensis*). El único hemíptero, *R. pedestris*, quedó posicionado en una rama distinta dentro del mismo clado donde están los isópteros; lo mismo sucedió con el único ixódido, *R. appendiculatus*. Este resultado es consistente con la clasificación taxonómica de los organismos, pues todas las especies analizadas pertenecen al subphyllum Insecta o Hexapoda, clase Pterygota, que tienen como característica común un par de alas (Figura 11).

Por otro lado, la relación que existe entre las especies que forman los subclados del subphyllum Crustacea, donde están *L. vannamei* y *H. Azteca*, y el subphyllum Hexapoda, donde están el resto de las especies de insectos, se explica por el hecho de que ambos grupos tienen como ancestro común al grupo de los Pancrustacea (Giribet y Ribera, 1998; Regier y col., 2010).

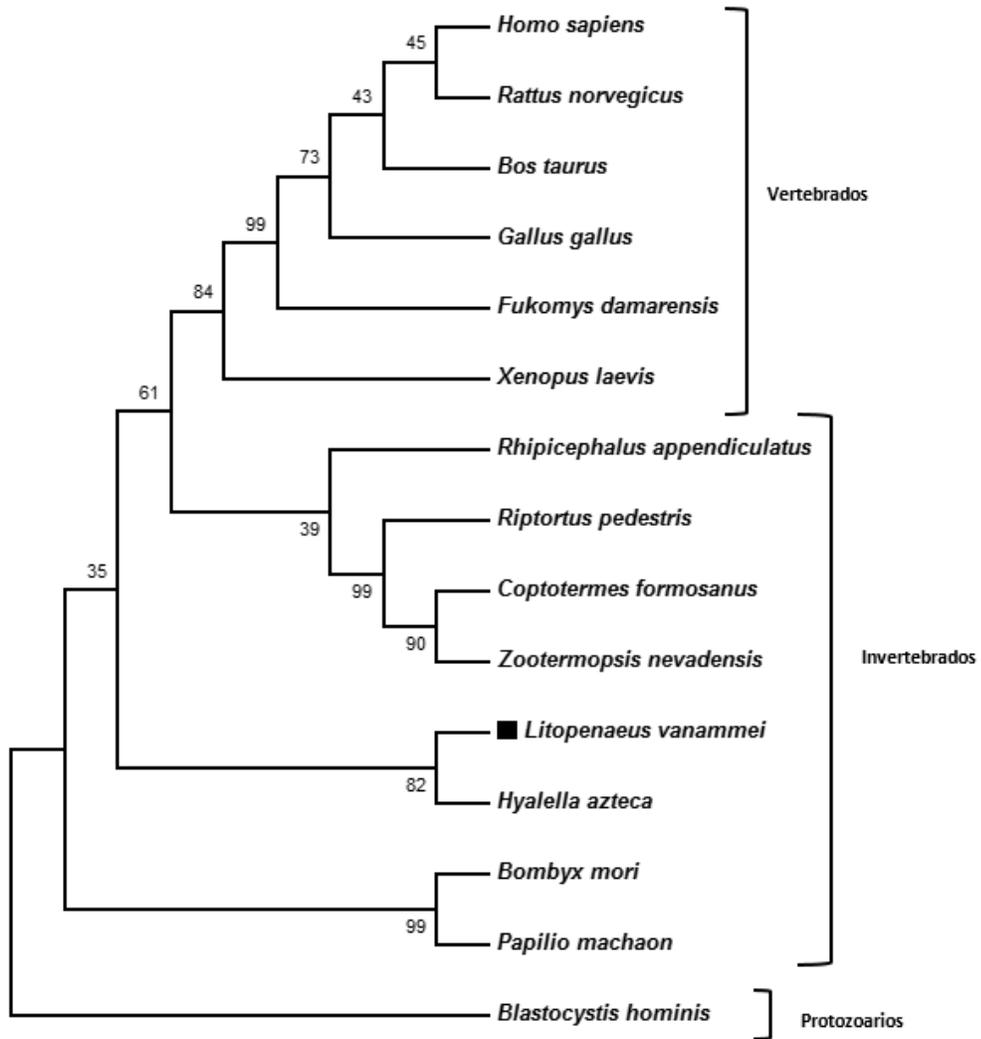


Figura 11. Árbol filogenético de la ciclofilina D, construido utilizando el método del vecino más cercano. Los números mostrados al lado de las ramas representan el porcentaje de las réplicas del bootstrap (1000 réplicas) en donde quedaron agrupados los diferentes taxones.

Respecto a la estructura de las ciclofilinas se ha determinado que todas estas proteínas poseen una estructura terciaria conservada, la cual consiste en 8 láminas beta antiparalelas y 2  $\alpha$ -hélices que las rodean, cuentan además con una pequeña  $\alpha$ -hélice en la cual se encuentra un residuo Trp que forma parte del sitio activo (Davis y col., 2010).

Dicho lo anterior, no es de sorprender que el modelo *in silico* de la ciclofilina D del camarón tenga una alta identidad con el modelo cristalográfico de su homólogo humano (PDB: 2Z6W; Figura 12).

La diferencia más notable detectada entre las dos estructuras es la longitud de la  $\alpha$ -hélice más pequeña H1, la cual está conformada por 3 aminoácidos (Pro-Trp-Leu) en el camarón, mientras que en el humano está formada por 5 aminoácidos (Thr-Asp-Trp-Leu-Asp).

Otras diferencias significativas entre ambas proteínas son la composición, longitud y el ángulo de plegamiento de las láminas  $\beta$  L1, L2, L3 y L4 (Figura 12), las cuales en el camarón están conformadas por los aminoácidos His-Arg-Ile-Ile, Gly-Ile-Leu-Ser-Met, Phe-Gly-Glu-Val-Val-Glu y Phe-Met-Cys-Gln-Gly, respectivamente, mientras que en el humano dichas láminas están conformadas por los aminoácidos Phe-His-Arg-Val-Ile, Val-Leu-Ser-Met, Val-Phe-Gly-His-Val-Ile-Glu y Met-Cys-Gln-Ala. Estas diferencias en la estructura tridimensional se encuentran cerca de la región del sitio activo de la enzima y se sugiere pudieran influir en la especificidad o afinidad al sustrato en la enzima del camarón, tal y como lo sugirieron Davis y colaboradores en 2010, quienes argumentan que pequeños cambios en la estructura tridimensional de diferentes isoformas de ciclofilina pueden promover diferencias en la preferencia por ciertos sustratos, sin embargo serán necesarios más estudios para confirmar dichas suposiciones.

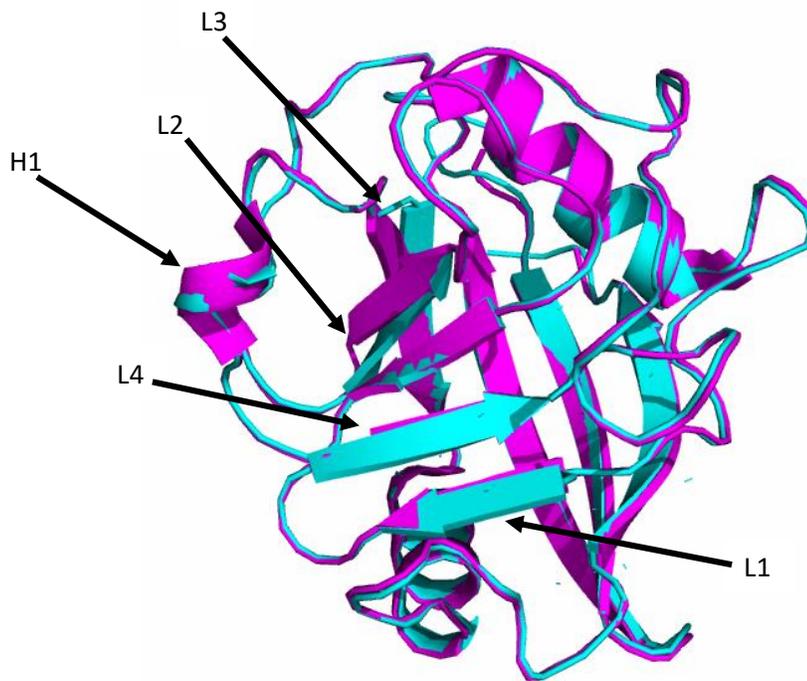


Figura 12. Comparación entre la estructura cristalográfica de la ciclofilina D humana (color magenta; PDB: 2Z6W) y el modelo predictivo de la ciclofilina D del camarón (color cian).

De acuerdo con estudios previos, en la ciclofilina A el mecanismo de la reacción de isomerización cis-trans más aceptado involucra principalmente al residuo de Arg83, el cual forma un puente de hidrógeno a través del grupo guanidino de su cadena lateral, con el nitrógeno de la prolina del sustrato, manteniéndola en su posición mientras el enlace peptídico que se encuentra hacia el lado del -COOH terminal realiza un giro de 180°, cambiando su conformación (Eisenmesser y col., 2002).

Así, tomando en cuenta las similitudes tanto en la secuencia de aminoácidos, como en las estructuras secundaria y terciaria entre las ciclofilinas A y D, es posible sugerir que este mecanismo de catálisis es compartido entre los miembros de esta familia de enzimas, incluidas la ciclofilina D humana y la del camarón. Esta idea se refuerza por el hecho de que la localización espacial de los residuos que forman parte del sitio activo de la enzima es prácticamente idéntica entre las estructuras de la enzima humana y la del camarón (Figura 13).

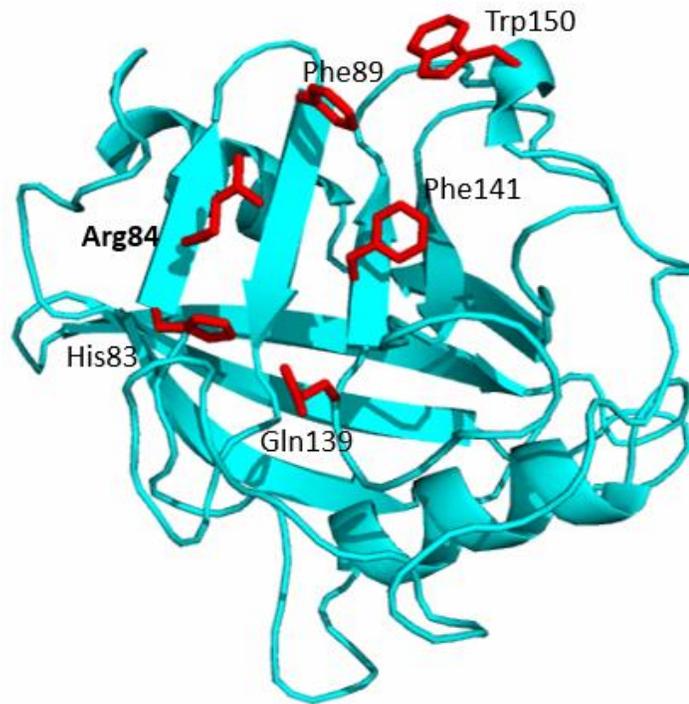


Figura 13. Representación del sitio activo de la ciclofilina D del camarón blanco.

En cuanto al sitio de unión de la ciclosporina A, que es el inhibidor específico de las ciclofilinas, se sabe que las interacciones principales entre la enzima y la molécula de ciclosporina son vía contactos hidrofóbicos y puentes de hidrógeno (Kajitani y col., 2007). Además, esta unión involucra a 5 de los 6 residuos que componen el sitio catalítico, por lo que la inhibición que ejerce la molécula de ciclosporina A sobre las ciclofilinas es de tipo competitiva.

Al igual que en el sitio activo, la ubicación espacial de los residuos que forman parte del sitio de unión a ciclosporina A se encuentra prácticamente sin cambios entre la ciclofilina D humana y la del camarón, por lo que se puede asumir que la ciclofilina D del camarón también puede ser inhibida por ciclosporina A (Figura 14).

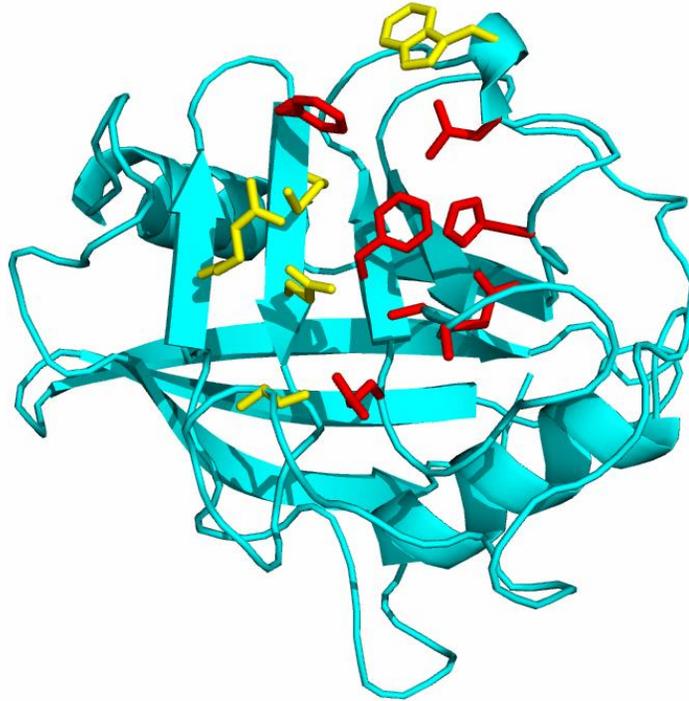


Figura 14. Representación del sitio de unión a ciclosporina A de la ciclofilina D del camarón. En color amarillo se encuentran los aminoácidos que interactúan mediante puentes de hidrógeno, mientras que en color rojo se encuentran los aminoácidos que se unen mediante interacciones hidrofóbicas.

### **Identificación de la Proteína en Extractos Proteicos de las Mitocondrias Aisladas del Camarón en Condiciones de Hipoxia-Reoxigenación**

Para confirmar la presencia de la ciclofilina D en las mitocondrias del camarón y evaluar el efecto del estrés oxidativo en la expresión de esta enzima y así poder inferir sobre su posible función y participación en la respuesta a la hipoxia, se utilizaron las mitocondrias aisladas de camarones previamente sometidos a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto en 5 tratamientos experimentales: normoxia (control), hipoxia 6 h, hipoxia 12 h, reoxigenación 6 h y reoxigenación 12 h. Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida para separar las proteínas mitocondriales como lo muestra el gel de la Figura 15.

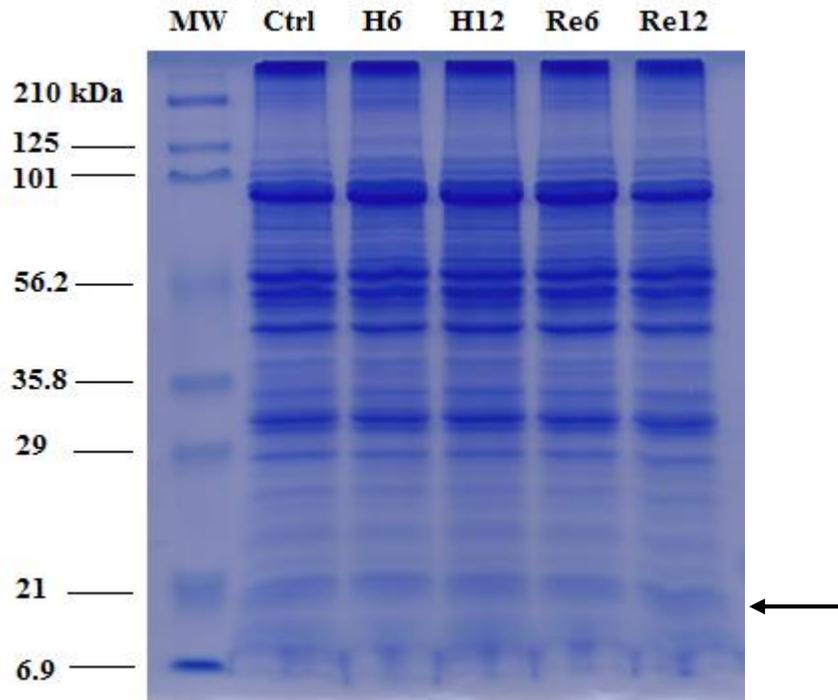


Figura 15. Separación de proteínas mitocondriales de los pleópodos del camarón por SDS-PAGE. MW: marcador de peso molecular, Ctrl: control, H6: hipoxia 6 h, H12: hipoxia 12 h, Re6: reoxigenación 6 h, Re12: reoxigenación 12 h. Se marca con una flecha la banda que posiblemente corresponde a la ciclofilina D.

Posteriormente, se realizó la inmunodetección de la enzima en cada una de las muestras, en la cual se observó una banda de una masa aproximada de 18 kDa, lo cual concuerda con el peso estimado de la proteína deducida del transcrito y es similar a la masa reportada para la ciclofilina D humana (Figura 16).

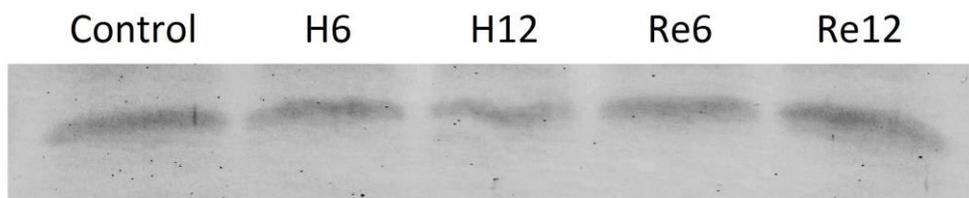


Figura 16. Inmunodetección de la ciclofilina D del camarón blanco en las muestras control, hipoxia 6 h (H6), hipoxia 12 h (H12), reoxigenación 6 h (Re6) y reoxigenación 12 h (Re12).

Los resultados no muestran diferencias significativas en la intensidad de las bandas entre la muestra control y los distintos tratamientos. Esto concuerda con lo observado por Wang y colaboradores (2009), quienes tampoco observaron diferencias significativas en la expresión de ciclofilina D entre mitocondrias de cerebro de ratones control y aquellos expuestos a 6 y 24 h de hipoxia (Wang y col., 2009).

En ese mismo año, Matas y colaboradores observaron a su vez que en ratones no había cambios en la expresión de la ciclofilina D entre las fracciones solubles de mitocondrias control y aquellas obtenidas de tejidos sometidos a fístula aorto-caval. Sin embargo, en ese mismo estudio se observó que en las mitocondrias sometidas a fístula aorto-caval hubo un incremento de tres veces en la cantidad de ciclofilina D unida a la membrana, esto en comparación con las mitocondrias del control. Así, los autores sugirieron que el estrés oxidativo no genera un incremento neto en la concentración de la enzima, sino que se incrementa la afinidad de la ciclofilina D por los componentes del poro de la transición de la permeabilidad (Matas y col., 2009).

Por otro lado, Gauba y colaboradores (2017) si encontraron cambios y una expresión creciente de ciclofilina D en ratones conforme su edad iba avanzando, sugiriendo que una mayor expresión de esta proteína podría estar ligada a una mayor producción de especies reactivas de oxígeno y la subsecuente aparición de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Gauba y col., 2017). Otros estudios también han logrado relacionar la presencia de la ciclofilina D y su interacción con la  $F_1F_0$ -ATP sintasa durante la apertura transitoria del poro de transición de la permeabilidad, con la capacidad de respuesta de las mitocondrias a la hipoxia y la protección que este pre-acondicionamiento le confiere al músculo cardíaco (Huang et al., 2014).

En otro estudio, Itani y colaboradores (2016) reportaron, utilizando un modelo murino, que en presencia de especies reactivas de oxígeno, específicamente  $H_2O_2$ , la expresión de la ciclofilina D no se veía afectada, sin embargo, se llevaba a cabo una glutationilación de la proteína, específicamente en el residuo Cys203, el cual se ha sugerido es sensible al estado redox del entorno mitocondrial. Esta modificación activa a la ciclofilina D, lo que genera una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, lo cual se ha asociado a procesos como hipertensión y relajación vascular alterada (Itani y col., 2016).

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que, en el camarón, la expresión de esta enzima no se ve modificada por un ambiente de estrés oxidativo, sin embargo, esto no permite descartar posibles cambios en la actividad de las enzimas y se desconoce aún si existen modificaciones post-traduccionales y una posible función de la ciclofilina en algún proceso patológico del camarón, o su participación en el fenómeno de transición de la permeabilidad de la membrana mitocondrial como se ha reportado en otras especies.

## CONCLUSIONES

Este estudio es el primer reporte que confirma la existencia de una ciclofilina D mitocondrial en los crustáceos, cuyo transcrito en el camarón blanco del pacífico *L. vannamei* se expresa de manera ubicua en todos los tejidos y su proteína deducida posee todas las características de una ciclofilina mitocondrial.

Así mismo, no se detectaron diferencias en la concentración de la ciclofilina D en las mitocondrias del camarón después de un evento hipoxia-reoxigenación, lo cual concuerda con algunos reportes existentes realizados en modelos mamíferos.

Los resultados obtenidos en esta investigación sientan las bases para el estudio de aquellas proteínas como la ciclofilina D, que además de su función enzimática parecen cumplir una función reguladora en la mitocondria, sin que está haya sido claramente establecida, aún en los modelos animales mas estudiados.

## **PERSPECTIVAS**

Se requieren estudios adicionales que permitan evaluar la posible participación de esta proteína durante la transición de la permeabilidad o en la respuesta del camarón a procesos patológicos asociados con la disfunción mitocondrial. Se recomienda realizar un análisis de posibles modificaciones post-traduccionales de la proteína en conjunto con ensayos de actividad enzimática en condiciones de estrés mitocondrial, como lo son las infecciones virales, ciclos de hipoxia-reoxigenación, ejercicio extenuante u otros tratamientos generadores de estrés oxidativo.

Por otro lado, también se recomienda realizar estudios enfocados a caracterizar las características fisicoquímicas y la estructura tridimensional de la ciclofilina D del camarón.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Arévalo-Rodríguez M., Wu X., Hanes S. D., Heitman J. (2004). Prolyl isomerases in yeast. *Front Biosci.* 9:2420-46.
2. Azzolin L., von Stockum S., Basso E., Petronilli V., Forte M. A., Bernardi P. (2010). The mitochondrial permeability transition from yeast to mammals. *FEBS Lett.* 584(12):2504-9.
3. Baines C. P., Kaiser R. A., Purcell N. H., Blair N. S., Osinska H., Hambleton M. A., Brunskill E. W., Sayen M. R., Gottlieb R. A., Dorn II G. W., Robbins J., Molkentin J. D. (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature.* 434(7033):658-662.
4. Baines C. P., Kaiser R. A., Sheiko T., Craigen W. J., Molkentin J. D. (2007). Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol.* 9(5):550-5.
5. Baker E. K., Colley N. J., Zuker C. S. (1994). The cyclophilin homolog NinaA functions as a chaperone, forming a stable complex in vivo with its protein target rhodopsin. *EMBO J.* 13(20):4886-95.
6. Basso E., Fante L., Fowlkes J., Petronilli V, Forte M. A., Bernardi P. (2005). Properties of the Permeability Transition Pore in Mitochondria Devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem.* 280(19):18558-18561.
7. Bernardi P. (2013). The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved?. *Front Physiol.* 4:95.
8. Beutner G., Ruck A., Riede B., Welte W., Brdiczka D. (1996). Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore. *FEBS Lett.* 396(2-3):189-95.
9. Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72(1):248-25.
10. Cannon B, Nedergaard J. (2004). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol Rev.* 84(1):277-359.
11. Chimeo C., Fernandez-Gimenez A. V., Campanella M., Mendez-Romero O., Muhlia-Almazan A. (2015). The shrimp mitochondrial FoF1-ATPase inhibitory factor 1 (IF1). *J Bioenerg Biomembr.* 47(5):383-93.

12. Chomczynski P., Sacchi N. (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem.* 162:156-159.
13. Connern C. P., Halestrap A. P. (1992). Purification and N-terminal sequencing of peptidyl-prolylcis-trans-isomerase from rat liver mitochondrial matrix reveals the existence of a distinct mitochondrial cyclophilin. *Biochem J.* 284:381-385.
14. Creighton T. E. (1990). Protein folding. *Biochem J.* 270(1):1-16
15. Crompton M., Virji S., Ward J. M. (1998). Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem.* 258(2):729-35.
16. Dall W., Hill B. J., Rothlisberg P. C., Staples D. J. (1990). The biology of the Penaeidae. 1th ed. *Advances in Marine Biology*, vol 27. New York (USA): Academic Press. 489 p.
17. Davis T., Walker J., Campagna-Slater V, Finerty P., Paramanathan R., Bernstein G., MacKenzie F., Tempel W., Ouyang H., Lee W., Eisenmesser E., Dhe-Paganon S. (2010). Structural and biochemical characterization of the human cyclophilin family of peptidyl-prolyl isomerases. *PLoS Biol.* 8(7):e1000439.
18. De Grave S., Dean Pentcheff N., Ahyong S., Chan T., Crandall K., Dworschak P., Felder D., Feldmann R., Francen C., Goulding L., Lemaitre R., Low M, Martin J., Ng P., Schweitzer C., Tan S., Tshudy D., Wetzer R. (2009). A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. *Raffles B Zool.* 21:1-109.
19. Di Lisa F, Carpi A, Giorgio V, Bernardi P. (2011). The mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in cardioprotection. *Biochim Biophys Acta.* 1813(7):1316-22.
20. Eisenmesser E., Bosco D., Akke M., Kern D. (2002). Enzyme dynamics during catalysis. *Science.* 295(5559):1520-3.
21. Elston T., Wang H., Oster G. (1998). Energy transduction in ATP synthase. *Nature.* 391(6666):510-3.
22. Ernster L., Schatz G. (1981). Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol.* 91(3Pt2):227-255.
23. FAO (2006-2016). Cultured Aquatic Species Information Programme. *Penaeus vannamei*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Briggs, M. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome.

24. Feldmann G., Haouzi D., Moreau A., Durand-Schneider A. M., Bringuier A., Berson A., Mansouri A., Fau D., Pessayre D. (2000). Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes matrix expansion and outer membrane rupture in Fas-mediated hepatic apoptosis in mice. *Hepatology*. 31(3):674-83.
25. Fischer G., Tradler T., Zarnt T. (1998). The mode of action of peptidylprolylcis/trans isomerases in vivo: binding vs. catalysis. *FEBS Lett*. 426(1):17-20.
26. Forte M., Gold B. G., Marracci G., Chaudhary P., Basso E., Johnsen D., Yu X., Fowlkes J., Rahder M., Stem K., Bernardi P., Bourdette D. (2007). Cyclophilin D inactivation protects axons in experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(18):7558-63.
27. Fruman D. A., Burakoff S. J., Bierer B. E. (1994). Immunophilins in protein folding and immunosuppression. *FASEB J*. 8(6):391-400.
28. Galat A. (1993). Peptidylprolinecis-trans-isomerases: immunophilins. *Eur J Biochem*. 216:689-707.
29. Galat A., Metcalfe S. M. (1995). Peptidylprolinecis/trans isomerases. *Prog Biophys Mol Biol*. 63(1):67-118.
30. Galluzzi L., Brenner C., Morselli E., Touat Z., Kroemer G. (2008). Viral Control of Mitochondrial Apoptosis. *PLoS Pathog*. 4:1-16.
31. Gauba E., Guo L., Du H. (2017). Cyclophilin D Promotes Brain Mitochondrial F1FO ATP Synthase Dysfunction in Aging Mice. *J Alzheimers Dis*. 55(4):1351-1362.
32. Giorgio V., Soriano M, Basso E, Bisetto E, Lippe G, Forte M, Bernardi P. (2010). Cyclophilin D in mitochondrial pathophysiology. *Biochim Biophys Acta*. 1797(6-7):1113-1138.
33. Giorgio V., Bisetto E., Soriano M. E., Dabbeni-Sala F., Basso E., Petronilli V., Forte M. A., Bernardi P., Lippe G. (2009). Cyclophilin D Modulates Mitochondrial F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP Synthase by Interacting with the Lateral Stalk of the Complex. *J Biol Chem*. 284(49):33982-8.
34. Giorgio V., von Stockum S., Antoniel M., Fabbro A., Fogolari F., Forte M., Glick G. D., Petronilli V., Zoratti M., Szabó I., Lippe G., Bernardi P. (2013). Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(15):5887-92.

35. Giribet, G. y Ribera, C. (1998). The position of arthropods in the animal kingdom: A search for a reliable outgroup for internal arthropod phylogeny. *Mol Phylog Evol.* 9:481-488.
36. Griffiths E. J., Halestrap A. P. (1995). Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J.* 307(Pt 1): 93–98.
37. Gunter T. E., Yule D. I., Gunter K. K., Eliseev R. A., Salter J. D. (2004). Calcium and mitochondria. *FEBS Lett.*, 567(1):96-102.
38. Halestrap A. P. (2014). The C Ring of the F1Fo ATP Synthase Forms the Mitochondrial Permeability Transition Pore: A Critical Appraisal. *Front Oncol.* 4:234.
39. Handy D. E., Loscalzo J. (2012). Redox Regulation of Mitochondrial Function. *Antioxid Redox Signal.* 16(11):1323–1367.
40. Hennig L., Christner C., Kipping M., Schelbert B., Rücknagel K. P., Grabley S., Küllertz G., Fischer G. (1998). Selective inactivation of parvulin-like peptidyl-prolylcis/trans isomerases by juglone. *Biochemistry.* 37(17):5953-60.
41. Holman J. D., Hand S. C. Metabolic Depression is Delayed and Mitochondrial Impairment Averted during Prolonged Anoxia in the ghost shrimp, *Lepidophthalmus louisianensis* (Schmitt, 1935). (2009). *J Exp Mar Bio Ecol.* 376(2):85-93.
42. Huang W. Y., Jou M. J., Peng T. I. (2014). Hypoxic preconditioning-induced mitochondrial protection is not disrupted in a cell model of mtDNA T8993G mutation-induced F1F0-ATP synthase defect: the role of mitochondrial permeability transition. *Free Radic Biol Med.* 67:314-29.
43. Hunter D.R., Haworth R.A., Southard J.H. (1976). Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J Biol Chem.* 251(16):5069-77.
44. Ichas F., Jouaville L. S., Mazat J.P. (1997). Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell.* 89(7):1145-53.
45. Ichas F., Mazat J. P. (1998). From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochim Biophys Acta.* 1366(1-2):33-50.
46. Itani H. A., Dikalova A. E., McMaster W. G., Nazarewicz R. R., Bikineyeva A. T., Harrison D. G., Dikalov S. I. (2016). Mitochondrial Cyclophilin D in Vascular Oxidative Stress and Hypertension. *Hypertension.* 67(6):1218-27.

47. Kajitani K., Fujihashi M., Kobayashi Y., Shimizu S., Tsujimoto Y., Miki K. (2008). Crystal structure of human cyclophilin D in complex with its inhibitor, cyclosporin A at 0.96-Å resolution. *Proteins*. 70(4):1635-9.
48. Kim J. S., Qian T., Lemasters J. J. (2003). Mitochondrial permeability transition in the switch from necrotic to apoptotic cell death in ischemic rat hepatocytes. *Gastroenterology*, 124(2):494-503.
49. Kokoszka J. E., Waymire K. G., Levy S. E., Sligh J. E., Cai J., Jones D. P., MacGregor G. R., Wallace D. C. (2004). The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature*. 427(6973):461-5.
50. Konrad C., Kiss G., Torocsik B., Adam-Vizi V., Chinopoulos C. (2012). Absence of Ca<sup>2+</sup>-Induced Mitochondrial Permeability Transition but Presence of Bongkrekate-Sensitive Nucleotide Exchange in *C. crangon* and *P. serratus*. *PLoS ONE*. 7(6): e39839.
51. Kovalev N., Nagy P. (2013). Cyclophilin A Binds to the Viral RNA and Replication Proteins, Resulting in Inhibition of Tombusviral Replicase Assembly. *J Virol*. 87(24):13330-13342
52. Krauskopf A., Eriksson O., Craigen W. J., Forte M. A., Bernardi P. (2006). Properties of the permeability transition in VDAC1<sup>-/-</sup> mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1757(5-6):590-5.
53. Krzywicka A., Beisson J., Keller A. M., Cohen J., Jerka-Dziadosz M., Klotz C. (2001). KIN241: a gene involved in cell morphogenesis in *Paramecium tetraurelia* reveals a novel protein family of cyclophilin-RNA interacting proteins (CRIPs) conserved from fission yeast to man. *Mol Microbiol*. 42(1):257-67.
54. Kulawiec M., Owens K. M., Singh K. K. (2009). Cancer cell mitochondria confer apoptosis resistance and promote metastasis. *Cancer Biol Ther*. 8(14):378-1385.
55. Kumari S., Roy S., Singh P., Singla-Pareek SL., Pareek A. (2013). Cyclophilins: proteins in search of function. *Plant Signal Behav*. 8(1): e22734.
56. Lee J., Kim S. S. (2010). An overview of cyclophilins in human cancers. *J Int Med Res*. 38(5):1561-74.
57. Lin D., Lechleiter J. D. (2002). Mitochondrial Targeted Cyclophilin D Protects Cells from Cell Death by PeptidylProlyl Isomerization. *J Biol Chem*. 277(34):31134–31141.
58. Mahmood T., Yang P. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North Am J Med Sci*. 4:429-34.

59. Martínez S., Furnham N., Asad S., Sillitoe I., Thornton J. (2014). The evolution of enzyme function in the isomerases. *Curr Opin Struct Biol.* 26:121–130.
60. Martinez-Cruz O., Arvizu-Flores A., Sotelo-Mundo R., Muhlia-Almazan A. (2015). The nuclear encoded subunits gamma, delta and epsilon from the shrimp mitochondrial F<sub>1</sub>-ATP synthase, and their transcriptional response during hypoxia. *J Bioenerg Biomembr* 47(3):223-234.
61. Martinez-Cruz O., Calderon de la Barca A.M., Uribe-Carvajal S., Muhlia-Almazan A. (2012). The function of mitochondrial F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-synthase from the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* muscle during hypoxia. *Comp Biochem Physi B.* 162(4):107–112.
62. Martinez-Cruz O., Garcia-Carreño F., Robles-Romo A., Varela-Romero A., Muhlia-Almazán A. (2011). Catalytic subunits atp $\alpha$  and atp $\beta$  from the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-synthase complex: cDNA sequences, phylogenies, and mRNA quantification during hypoxia. *J Bioenerg and Biomembr.* 43(2):119-133.
63. McKay R., Druyan R., Getz, M. Rabinowitz G. S. (1969). Intramitochondrial Localization of  $\delta$ -Aminolaevulate Synthetase and Ferrochelatae in Rat Liver. *Biochem J.* 114:455-461.
64. Menze M. A., Hutchinson K., Laborde S. M., Hand S. C. (2005). Mitochondrial permeability transition in the crustacean *Artemia franciscana*: absence of a calcium-regulated pore in the face of profound calcium storage. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 289(1): R68-76.
65. Montague J. W., Gaido M. L., Frye C., Cidlowski J. A. (1994). A calcium-dependent nuclease from apoptotic rat thymocytes is homologous with cyclophilin. Recombinant cyclophilins A, B, and C have nuclease activity. *J Biol Chem.* (29):18877-80.
66. Nakagawa T., Shimizu S., Watanabe T., Yamaguchi O., Otsu K., Yamagata H., Inohara H., Kubo T., Tsujimoto Y. (2005). Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature.* 434(7033):652-8.
67. Nelson D. L., Lehninger A., Cox M. M. (2005). *Principles of Biochemistry.* 4<sup>th</sup> ed. New York (USA): W. H. Freeman and Company. 1216 p.
68. Price E. R., Jin M., Lim D., Pati S., Walsh C. T., McKeon F. D. (1994). Cyclophilin B trafficking through the secretory pathway is altered by binding of cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(9): 3931–3935.

69. Puente E. (2009). Respuestas fisiológicas de juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, a condiciones oscilantes de oxígeno disuelto y temperatura (tesis de doctorado). Instituto Politécnico Nacional, Baja California Sur, México.
70. Qian T., Nieminen A. L., Herman B., Lemasters J. J. (1997). Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes. *Am J Physiol.* 273(6):1783-92.
71. Racotta I. S., Palacios E., Méndez L. (2002). Metabolic responses to short and long-term hipoxia in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Mar Fresh Behav Physiol.* 35(4):269-275.
72. Regier J. C., Shultz J. W., Zwick A., Hussey A., Ball B., Wetzer R., Martin J. W., Cunningham C. W. (2010). Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein-coding sequences. *Nature.* 463(7284):1079-83.
73. Rostam M. A., Piva T. J., Rezaei H. B., Kamato D., Little P. J., Zheng W., Osman N. (2015). Peptidyl-prolylisomerases: functionality and potential therapeutic targets in cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 42(2):117-24.
74. Siemen D., Ziemer M. (2013). What is the nature of the mitochondrial permeability transition pore and what is it not?. *IUBMB Life.* 65(3):255-62.
75. Söding J. (2005). Protein homology detection by HMM–HMM comparison. *Bioinformatics.* 21(7):951-60.
76. Stamnes M. A., Rutherford S. L., Zuker C. S. (1992). Cyclophilins: a new family of proteins involved in intracellular folding. *Trends Cell Biol.* 2(9):272-6.
77. Taanman J. (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta.* 1410:103-123.
78. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol Evol.* 30(12): 2725–2729.
79. Tanveer A., Virji S., Andreeva L., Totty N. F., Hsuan J. J., Ward J. M., Crompton M. (1996). Involvement of cyclophilin D in the activation of a mitochondrial pore by Ca<sup>2+</sup> and oxidant stress. *Eur J Biochem.* 238(1):166-72.
80. Tropschug M., Nicholson D. W., Hartl F., Köhler H., Pfanner N., Wachter E., Neupert W. (1988). Cyclosporin A-binding Protein (Cyclophilin) of *Neurospora crassa*: one gene codes for both the cytosolic and mitochondrial forms. *J Biol Chem.* 263(28):14433-14440.
81. Turrens J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 552:335–344.

82. Vieira H., Haouzi D., El Hamel C., Jacotot E., Belzacq A. S., Brenner C., Kroemer G. (2000). Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator. *Cell Death Differ.* 7(12):1146-54.
83. von Stockum S., Basso E., Petronilli V., Sabatelli P., Forte M., Bernardi P. (2011). Properties of Ca<sup>2+</sup> transport in mitochondria of *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem.* 286(48):41163-70.
84. Wang H., Oster G. (1998). Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase. *Nature.* 396(6708):279-82.
85. Wang P., Heitman J. (2005). The cyclophilins. *Genome Biol.* 6(7): 226.
86. Wang X., Carlsson Y., Basso E., Zhu C., Rousset C. I., Rasola A., Johansson B. R., Blomgren K., Mallard C., Bernardi P., Forte M. A., Hagberg H. (2009). Developmental shift of cyclophilin D contribution to hypoxic-ischemic brain injury. *J Neurosci.* 29(8):2588-96.
87. Weiss H., Friedrich T., Hofhaus G., Preis D. (1991). The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. *Eur J Biochem.* 197(3):563-76.
88. Woodfield K., Rück A., Brdiczka D., Halestrap A. (1998). Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. *Biochem J.* 336(Pt 2): 287–290.