



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

UNIDAD REGIONAL SUR

DIVISION DE CIENCIAS E INGENIERIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUIMICO-BIOLÓGICAS

Y AGROPECUARIAS

"EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE HIF-1ALFA
SOBRE LA EXPRESION GENICA DE ENZIMAS
ANTIOXIDANTES EN CAMARON BLANCO
INFECTADO CON EL WSSV"

TESIS PROFESIONAL

QUE FARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO BIOLOGO CLINICO

PRESENTA

Jennifer Joceline Doom Llamas

NAVOJOA; SONORA

JUNIO DEL 2018

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



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

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS

“Efecto del silenciamiento de HIF-1 alfa sobre la expresión
génica de enzimas antioxidantes en camarón blanco
infectado con el WSSV”



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”

TESIS PROFESIONAL
Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

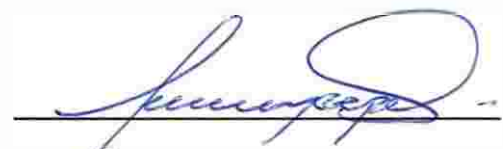
Presenta:
Jennifer Joceline Poom Llamas

Navojoa, Sonora.

Junio del 2018

APROBACIÓN

Los miembros del jurado asignado para revisar la tesis profesional de Jennifer Joceline Poom Llamas, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de Químico Biólogo Clínico.



Dr. José Guadalupe Soñanez Organis

Presidente



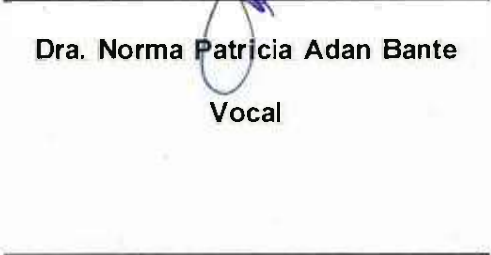
Dr. Jesús Alfredo Rosas Rodríguez

Secretario



Dra. Norma Patricia Adan Bante

Vocal



Dra. Lilian Karem Flores Mendoza

Suplente

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permite y se agradece las citas breves del material contenido en este trabajo de tesis sin permiso especial de los autores, siempre y cuando se de crédito correspondiente al autor y a la Universidad de Sonora, Unidad Regional Sur.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en este trabajo de tesis, deberá dar créditos a la Universidad de Sonora, previa aprobación escrito del manuscrito en cuestión del director de tesis.



M.C. Ramona Icedo García

Jefa del Depto. de Ciencias Químico-Biológicas y Agropecuarias

AGRADECIMIENTOS

A mi Alma mater por permitirme formarme como profesionista, al igual que coincidir con grandes personas.

A mi comité de tesis por todo su apoyo.

A mi tutor Dr. José Guadalupe Soñanez Organis, por siempre estar apoyándome en el transcurso de mi carrera, guiarme y enseñarme en todo momento para concluir con este y otros proyectos.

A Dr. Jesús Alfredo Rosas Rodríguez, que siempre estuvo de apoyo y con la mejor disponibilidad para ayudar al igual que mi tutor.

A Dra. Paty por ser como mamá y apoyarme en el transcurso de mi carrera.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, proyecto 220496) y al Programa de Fortalecimiento de la Calidad Educativa (PFCE, SEP), por proveer el capital que permitió realizar los experimentos de laboratorio.

DEDICATORIAS

Primero a Dios por nunca dejarme caer a pesar de los obstáculos.

A mi familia por siempre brincar me lo mejor de ellos; ejemplo, dedicación, fuerza, humildad... pero sobre todo enseñarme el significado de "OHANA", en especial a mis papás por su apoyo incondicional y ejemplo de humanos.

A mi Manita por siempre ser mi sostén, confidente y ejemplo de vida al igual que mamá, las amo.

A mis hombrecitos (Manuel y Jonathan), por que ni la tesis pudo tanto como ustedes, los amo mis amores.

A mis amigos Sebastián, Isabel, Miguel, Dany, Joan, Lupillo, Mire, Viry, Abel, José, Alex, Melissa, Cris y pale por siempre estar ahí para mí en todo momento y ayudarme a crecer en todos los aspectos. En especial Arturo por siempre darme un gran ejemplo de que el rendirse nunca es una opción y que la calidad humana es de las cosas más valiosas que podemos brindar.

A mis compañeros de laboratorio, Jeravy, Arquímedes, Chiprés, Melissa, José, Denisse, Susana, Diana, por siempre estar ahí brindándome su apoyo y compañerismo.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
DEDICATORIAS	5
INTRODUCCIÓN	9
ANTECEDENTES	11
I.- Camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i>	11
Virus del síndrome de la mancha blanca	11
II.- Especies reactivas de oxígeno	12
Defensas celulares contra las ROS	13
Expresión de genes de enzimas antioxidantes en camarón infectado con el WSSV	14
III.-Factor inducido por hipoxia 1 (HIF-1)	15
Estructura y Función	15
HIF1 en camarón blanco	17
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	20
Objetivo General	20
Objetivos Específicos	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Silenciamiento de HIF-1 α e infección con el WSSV	21
Extracción de RNA total, digestión de DNA genómico y síntesis de cDNA	21
Diseño de oligonucleótidos	22
Cuantificación del mRNA para cMnSOD, catalasa, GST y GPx	23
Análisis estadístico	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
Amplificación y curvas estándar de cMnSOD, catalasa, GST, GPx	25
Niveles de mRNA para cMnSOD, catalasa, GST y GPx	30
CONCLUSIÓN	38
BIBLIOGRAFÍA	39

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Representación gráfica de la regulación HIF-1 α	16
2.	Análisis de integridad del RNA ^t extraído de músculo y hepatopáncreas.	25
3.	Productos de PCR obtenidos a partir de cDNA de camarón blanco utilizados para realizar las curvas de calibración	27
4.	Diagrama de temperatura de disociación para el amplicón de cMnSOD, catalasa, GST y GPx amplificados por qPCR.	28
5.	Curvas estándar utilizadas para la cuantificación del mRNA para cMnSOD, catalasa, GST y GPx.	29
6.	Niveles de expresión de cMnSOD en músculo y hepatopáncreas de camarones infectados con el WSSV y con HIF-1 α silenciado.	30-31
7.	Niveles de expresión de catalasa en hepatopáncreas y músculo de camarones infectados con el WSSV y con HIF-1 α silenciado.	32
8.	Niveles de expresión de GST en hepatopáncreas y músculo de camarones infectados con el WSSV y con HIF-1 α silenciado.	33-34
9.	Niveles de expresión de GPx en hepatopáncreas y músculo de camarones infectados con el WSSV y con HIF-1 α silenciado.	35

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Secuencia de oligonucleótidos específicos para cMnSOD, catalasa, GST yGPx.	26

INTRODUCCIÓN

El camarón blanco *Litopenaeus vannamei* se encuentra distribuido en la costa del pacífico desde el Golfo de California hasta el norte de Perú (Menz A. y Blake B.F., 1980.) y es uno de los peneidos más estudiados, comercializados y cultivados en la costa del Pacífico y algunas zonas de Asia (Rosenberry R., 1994; Treece G.D., 2000). Sin embargo, su supervivencia es afectada por diversos virus, como el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) (Aguirre G. y Valle F., 2000; Godínez-Siordia D.E. y col., 2012). A nivel celular, el WSSV causa estrés oxidativo mediante la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS), esto como mecanismo de defensa ante la infección (Primero se produce radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), a partir de este mediante una serie de reacciones se produce peróxido de hidrogeno (H_2O_2), oxígeno singlete (O_2), radical hidroxilo (OH^{\cdot}), entre otras) (Li Y. y col., 2016; Liu K. F y col., 2010; Mohankumar y Ramasamy, 2006; Mohankumar K. y Ramasamy P., 2006; Muñoz M. y col., 2000).

Las ROS son moléculas altamente reactivas que tienen uno o más electrones desapareados (radicales libres) de oxígeno. Las más comunes son el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el oxígeno singlete (1O_2). Las ROS producen cambios patológicos en tejidos y en la función de diferentes órganos ya que pueden dañar proteínas, DNA, y membranas celulares. Para contrarrestar las ROS, las células cuentan con sistemas de defensa antioxidantes. (Apel K. y Hirt H., 2004; Foyer C.H. y Noctor G., 2005; Halliwell B., 2006; Halliwell B. y Gutteridge J.M., 1986; Livingstone D.R., 2001).

Las defensas antioxidantes ayudan a mantener el ambiente reductor dentro de cada célula, previniendo cualquier daño causado por las ROS. Estas son de tipo enzimático como; superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión S transferasa (GST), y compuestos de bajo peso molecular de tipo no enzimático como; ácido ascórbico (A o vitamina C), glutatión reducido (GSH), carotenoides, α -tocoferol (vitamina E) y retinol (vitamina A), (Li C. y col., 2010; Lushchak V.I., 2011; Yang C. y col., 2011; Zhang y col., 1990; Zhang L. y col., 2011; Zhang Y. y col., 1990). En camarones infectados con el WSSV, la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, catalasa, GPx y GST disminuyen

durante las primeras horas de la infección (Taylor-P y col., 2012). Estudios recientes en hemocitos de camarón blanco demuestran que las ROS producidas durante la infección con el WSSV son contrarrestadas mediante la regulación del efecto Warburg vía PI3K-Akt-mTOR (Chen I. T. y col., 2016). El efecto Warburg es una respuesta anormal de la glucólisis en donde aumenta el consumo de glucosa y acumulación de lactato, y la cual es regulada a nivel transcripcional por el factor inducido por hipoxia -1 (HIF-1) (Semenza G. L., 2000).

El factor inducido por hipoxia 1 (HIF-1) es un factor de transcripción que participa en la regulación de genes involucrados en el metabolismo energético anaerobio (Semenza G.L., 2000) y la respuesta inmune (Zinkernagel A.S. y col., 2007). HIF-1 consiste en una subunidad α (HIF-1 α) regulada por oxígeno y una constitutiva subunidad β (HIF-1 β). En camarón blanco, HIF-1 regula la glucólisis anaerobia durante condiciones de hipoxia mediante la expresión de genes glucolíticos claves (Soñanez-Organis J.G. y col., 2011). Resultados recientes demuestran que HIF-1 regula la glucólisis inducida por el WSSV en tejidos de camarón blanco infectados mediante la inducción de la lactato deshidrogenasa, enzima que reduce el piruvato a lactato (Hernandez-Palomares M.L.E. y col., 2018).

Durante la infección por el WSSV, se producen ROS como un mecanismo de defensa del camarón en contra del virus y se activa el efecto Warburg para satisfacer las necesidades energéticas tanto del camarón como del virus, el cual en última instancia genera ROS por un desbalance en el metabolismo oxidativo (Chen I.T. y col., 2011). Gracias al silenciamiento de HIF-1 α se observó que disminuye la carga viral y mortalidad de camarones infectados con el WSSV, induciendo la actividad de enzimas antioxidantes, y así disminuyendo el daño oxidativo (Miranda-Cruz MM. y col., "En revisión"). Por lo tanto, en este trabajo se analizó la expresión de las enzimas antioxidantes en camarones infectados con WSSV y con HIF-1 silenciado.

ANTECEDENTES

I.- Camarón blanco *Litopenaeus vannamei*

El camarón blanco *Litopenaeus vannamei* es el peneido con mayor valor comercial y que se cultiva a lo largo de la costa del Pacífico y en algunas zonas de Asia (Rosenberry R., 1994; Treece G.D., 2000). En la actualidad la acuicultura es la actividad agroindustrial de mayor desarrollo a nivel mundial, con un volumen mayor a 60 millones de toneladas y un valor aproximado de 15 mil millones de dólares. A nivel nacional, Sonora se encuentra en primer lugar de producción de camarones con más de 50 mil toneladas anuales (Corona-Valenzuela J.C., 2016-2021; SAGARHPA, 2016).

La supervivencia y tasa de crecimiento del camarón blanco depende de la salinidad (Bray W.A. y col., 1994), la temperatura (Wyban J. y col., 1995) y de la interacción entre salinidad-temperatura (Díaz F. y col., 2001; Ponce-Palafox J. y col., 1997; Zhang P. y col., 2006). Por otro lado, a la fecha se han descrito más de 20 virus que afectan directa o indirectamente al camarón, entre los que destacan el virus del síndrome de taura (TSV), virus de la cabeza amarilla (YHV) y el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) (Aguirre G. y Valle F., 2000; Godínez-Siordia D.E. y col., 2012)

Virus del síndrome de la mancha blanca

El síndrome de la mancha blanca es causado por el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV, por sus siglas en inglés) y es una de las principales enfermedades del camarón en el mundo. El WSSV causa el 100% de mortalidad acumulada entre los 2-10 días pos-infección en granjas de camarón. El WSSV contiene un DNA circular de doble cadena con un peso

aproximado de 290 kbp, se encuentra dentro de la familia *Nimaviridae* y del género *whispovirus* (Chen L.L. y col., 2002; Van-Hulten M.C. y col., 2001; Yang F. y col., 2001).

La sintomatología que causa el WSSV sobre las diferentes especies de camarón son pequeñas manchas blancas (0.5 – 3 mm) en el exoesqueleto y dentro de la epidermis, letargia, nado errático, pérdida de apetito, decoloración rojiza y pérdida de la cutícula (Cuéllar-Anjel J., 2013; Sanchez-Paz A., 2010). En camarón blanco, el WSSV induce cambios metabólicos para satisfacer su demanda energética necesaria para su replicación y estrés oxidativo mediante la producción especies reactivas del oxígeno (ROS), como un mecanismo de defensa del camarón para contrarrestar la infección (Liu K. F y col., 2010; Mohankumar y Ramasamy, 2006; Parrilla-Taylor D.P. y col., 2013; Téllez-Castañeda M., 2016).

II.- Especies reactivas de oxígeno

Las ROS son moléculas altamente reactivas que contienen uno o más electrones desapareados (radicales libres) de oxígeno, como superóxido (O_2^-), hidroxilo (OH^-), peróxido (RO_2^-) e hidroperoxilo (HO_2^-), así como también ciertos agentes oxidantes no radicales como el ácido hipocloroso ($HOCl$), el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), el oxígeno singlete (1O_2) y el ozono (O_3), los cuales pueden llegar a convertirse fácilmente como radicales (Birben y col., 2012; Halliwell, B., 1989). Las ROS son muy letales, ya que causan daño al DNA, proteínas, y lípidos de la célula afectando su funcionamiento normal (Apel K. y Hirt H., 2004; Foyer C.H. y Noctor G., 2005; Valko y col., 2006).

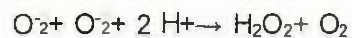
Las ROS se generan constantemente a niveles basales durante un metabolismo normal, y son esenciales para la función normal de la célula participando en reacciones enzimáticas, transducción de señales, expresión génica, transporte de electrones, activación de factores de transcripción y acción antimicrobiana (Fridovich, 2004; Muñoz, 2000). La sobreproducción de ROS genera estrés oxidativo, en donde cambia el equilibrio redox (oxidantes/antioxidantes) a favor de los oxidantes, donde la capacidad de las defensas

antioxidantes no son capaces de contrarrestar a las ROS (Birben y col., 2012; Foyer C.H. y Noctor G., 2005; Halliwell y Gutteridge, 1999; Zhang y col., 1990).

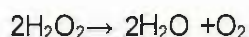
Defensas celulares contra las ROS

Las defensas antioxidantes son los mecanismos que utiliza la célula para combatir el estrés oxidativo y se dividen en enzimáticos y no enzimáticos. Las defensas antioxidantes del tipo no enzimático comprenden compuestos de bajo peso molecular como por ejemplo ácido ascórbico (vitamina C), glutatión reducido (GSH), carotenoides, flavonoides, prolina, α -tocoferol (vitamina E) y retinol (vitamina A). Las defensas antioxidantes del tipo enzimático comprenden enzimas que convierten a las ROS en compuestos no tóxicos, y destacan la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasa (GPx), el glutatión S transferasa (GST), tioredoxinas (TRX), peroxirredoxinas (PRXs), glutaredoxinas, ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) y deshidroascorbato reductasa (DHAR) (Birben y col., 2012; Miller G. y col., 2010).

Superóxido dismutasa (SOD, E.C. 1.15.1.1). Es una metaloenzima presente en todos los organismos aeróbicos, y participa catalizando la eliminación de O_2^- convirtiéndolo en O_2 y H_2O_2 , eliminando la posibilidad de producir el radical hidroxilo (OH). SOD es clasificada según el ion metálico al que se encuentre unida por lo que existen tres isoenzimas localizadas en diferentes sitios de la membrana; Mn-SOD (mitocondrial, citosol), Fe-SOD (cloroplastos) y Cu/Zn-SOD (citosol, peroxisomas y cloroplastos) (Kaushik y Aryadeep, 2014; Mittler, 2002). Su mecanismo de reacción es el siguiente:



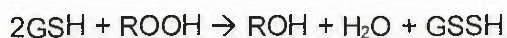
Catalasa (E.C. 1.11.1.6). Es una hemo enzima responsable de catalizar el H_2O_2 , convirtiéndolo en H_2O y O_2 . Se destaca en el sistema inmune innato (Ha E.M. y col., 2005). La catalasa puede encontrarse en citosol, cloroplastos, retículo endoplásmico y mitocondrias (Halliwell y Gutteridge, 1999; Kaushik y Aryadeep, 2014; Mhamdi y col., 2010). Su mecanismo de reacción es el siguiente:



Glutación peroxidasa (GPx, E.C. 1.11.1.9). Está formada por cuatro subunidades idénticas y cada una con un átomo de selenio. Actúa eliminando H_2O_2 , utilizando al glutati6n reducido (GSH) como agente reductor. Se localiza en mitocondria, cloroplastos, citosol y retículo endoplásmico (Halliwell. B., 1989; Kaushik y Aryadeep, 2014). Su mecanismo de reacción es:



Glutati6n S-transferasa (GST, E.C. 2.5.1.18). Pertenece a la familia de isoenzimas implicadas a la desintoxicaci6n de xenobi6ticos (Hayes y Mantle, 1986). Estas interactúan con GSH catalizando el ataque nucleofílico sobre sustratos electrofílicos/lipófilos. Se localizan en mitocondria, microsomas y citosol (Hayes J.D. y Pulford D.J., 1995; Letelier y col., 2006; Sheehan y col., 2001). Su mecanismo de reacción es:



Expresi6n de genes de enzimas antioxidantes en camar6n infectado con el WSSV

En diferentes estudios realizados de camarones infectados con WSSV muestran la expresi6n de enzimas antioxidantes en diferentes tejidos. : En hemocitos y hepatopáncreas de *Fenneropenaeus chinensis* infectados con WSSV, la expresi6n génica de catalasa disminuye a las primeras horas pos-infecci6n, pero aumenta conforme la infecci6n progresa (Zhang Q. y col., 2008). Mientras que la expresi6n de la SOD de manganeso mitocondrial (mMnSOD) tiene un patr6n contrario en hepatopáncreas y hemocitos aumentando durante las primeras horas

de la infección y disminuyen conforme avanza la infección (Zhang Q. y col., 2014; Zhang Q. y col., 2007).

En *L. vannamei*, la expresión de la SOD cobre/zinc (ZnCuSOD), disminuye en hepatopáncreas y hemocitos de camarones infectados con el WSSV (Tian y col., 2011), mientras que la expresión de la SOD de manganeso citoplasmática (cMnSOD) aumenta en hemocitos a las primeras horas pos-infección (Gómez-Anduro G. A. y col., 2006). La expresión de GST y GPx también aumenta en hemocitos y hepatopáncreas a las primeras horas de la infección en *Exopalaemon carinacauda* y *F. chinensis* (Duan Y. y col., 2013; Kuan-Fu L. y col., 2010).

Por otro lado, estudios recientes demuestran que el WSSV induce el efecto Warburg, una respuesta anormal de la glucólisis, en hemocitos de camarones infectados por medio de la vía PI3K-Akt-mTOR, como una respuesta de evasión del virus para restaurar el equilibrio redox del huésped y poder establecer la infección (Chen I. T. y col., 2016). En mamíferos, la vía PI3K-Akt.mTOR induce la estabilidad y activación del principal regulador transcripcional de la glucólisis, el factor inducido por hipoxia 1 (Su M.A. y col., 2014).

III.-Factor inducido por hipoxia 1 (HIF-1)

Estructura y Función

El factor inducido por hipoxia 1 (HIF-1) es un factor de transcripción compuesto por una subunidad α (HIF-1 α) regulada por oxígeno y una subunidad β constitutiva (HIF-1 β) (Semenza G.L., 2001). HIF-1 α tiene un dominio de degradación altamente sensible al oxígeno (ODD: *Oxygen-Dependent Degradation Domain*) que regula su estabilidad. Bajo normoxia, el dominio ODD es hidroxilado por proliil-hidroxilasas permitiendo su interacción con la proteína Von Hippel-Lindau (pVHL) para su posterior degradación vía los proteosomas (Fedele y col., 2002;

Pouyssegur y col., 2006). En contraste, durante hipoxia la hidroxilación de HIF-1 α disminuye provocando su estabilización y translocación al núcleo en donde se dimeriza con HIF-1 β y se acopla a los coactivadores para llevar a cabo su función (Figura 1) (Katschinski D.M. y col., 2002; Semenza G.L., 2001).

HIF-1 regula una gran variedad de genes que participan en la la glucólisis, eritropoyesis y angiogénesis durante condiciones de hipoxia (Semenza G.L., 2001). Entre los genes que regula HIF-1 se encuentran los relacionados al metabolismo energético como lo son transportadores de glucosa (GLUT-1 y GLUT-4) y enzimas glucolíticas (aldosa A, enolasa 1, lactato deshidrogenasa A, fosfofructoquinasa L y fosfoglicerato quinasa 1) (Semenza, 1998).

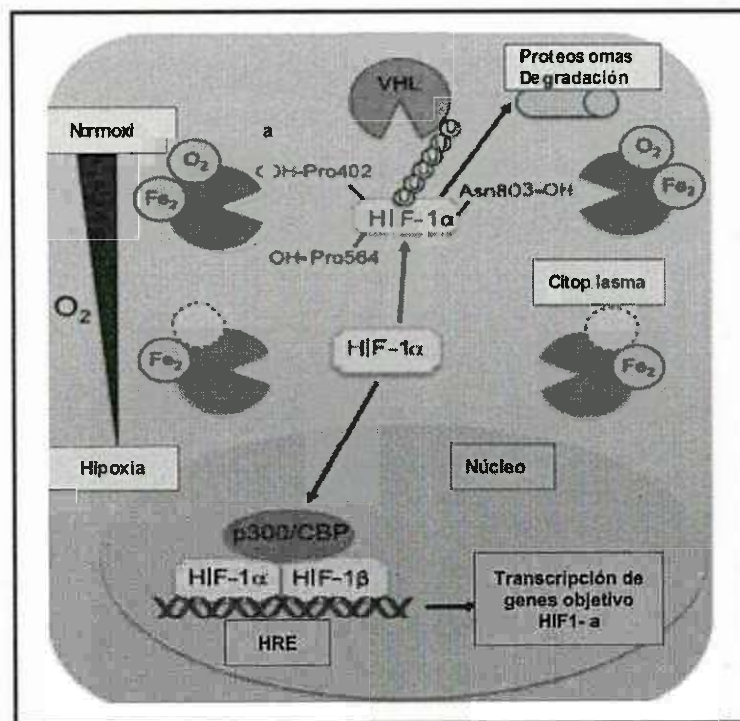


Figura 1. Representación gráfica de la regulación HIF-1 α (Palazon A. y col., 2014).

HIF1 en camarón blanco

En camarón blanco, las subunidades de HIF-1 son expresadas de manera tejido-específico durante normoxia e hipoxia (Soñanez-Organis J.G. y col., 2009). Además, el silenciamiento de ambas subunidades demostró que juega un papel clave en el metabolismo energético anaerobio de camarones sometidos a hipoxia a través de la inducción de genes glucolíticos claves como hexocinasa y lactato deshidrogenasa (Soñanez-Organis J.G. y col., 2011; Soñanez-Organis J.G. y col., 2012).

Estudios recientes obtenidos por nuestro grupo de trabajo sugieren que HIF-1 regula la glucólisis inducida por el WSSV a través de la regulación de LDH en tejidos de camarones infectados (Hernandez-Palomares M.L.E. y col., 2018). Además, el silenciamiento de HIF-1 α disminuye la carga viral y mortalidad de camarones infectados con el WSSV, así como el daño oxidativo (proteínas carboniladas y peroxidación de lípidos) (Miranda-Cruz MM. y col., "En revisión"). Por otro lado, se sabe que durante una infección con WSSV, el camarón genera ROS como un mecanismo de defensa contra la infección y al mismo tiempo se produce un cambio en el metabolismo energético activando el efecto Warburg satisfaciendo tanto las necesidades energéticas del camarón como las del virus, el cual genera ROS por un desequilibrio en el metabolismo oxidativo (Chen I.T. y col., 2011). Sin embargo, el efecto de HIF-1 sobre la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes se desconoce en camarones infectados con el WSSV.

JUSTIFICACIÓN

El camarón blanco es la principal especie de camarón cultivada en el estado de Sonora, y su producción se ve afectada por patógenos como el WSSV el cual estimula la producción de ROS. En camarón blanco se ha demostrado que la expresión de genes que codifican para las enzimas antioxidantes SOD, catalasa, GST y GPx disminuye por la infección con el WSSV. HIF-1 es un factor de transcripción activado por ROS, y en camarón blanco HIF regula la glucólisis inducida por la infección con el WSSV; si bien dicha infección provoca que el camarón produzca ROS como mecanismo de defensa ante el virus, y al mismo tiempo se activa el efecto warburg satisfaciendo el metabolismo energético de ambos, generándose ROS por un desbalance en el metabolismo oxidativo. Sin embargo, se desconoce su participación sobre la respuesta antioxidante.

HIPÓTESIS

El silenciamiento de HIF-1 α aumenta la expresión de cMnSOD, catalasa, GST y GPx en camarón blanco infectado con el WSSV.

OBJETIVOS

Objetivo General

Cuantificar la expresión génica de la cMnSOD, catalasa, GST y GPx en camarón blanco infectado con el WSSV y con HIF-1 α silenciado.

Objetivos Específicos

- Diseñar oligonucleótidos específicos para cMnSOD, catalasa, GST y GPx.
- Cuantificar el mRNA para cMnSOD, catalasa, GST y GPx en hepatopáncreas y músculo camarón blanco infectado con el WSSV y con HIF-1 α silenciado por medio de PCR cuantitativo.

MATERIALES Y METODOS

Silenciamiento de HIF-1 α e infección con el WSSV

Se utilizaron camarones juveniles de *L. vannamei* (14 ± 2 gr) libres de patógenos específicos (SPF, *Specific Pathogen Free*) proporcionados por una granja camaronera del estado de Sonora, México. Los camarones se trasladaron al Laboratorio de Fisiología de Invertebrados Marinos de la Coordinación de Organismos de Origen Animal del Centro de investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. en Hermosillo, Sonora. Posteriormente, los camarones fueron aclimatados por 4 semanas en tanques de 500 L con una temperatura de 28 °C, 35 ppm de salinidad, luz controlada, aeración constante y alimentados con camaronina 35 (Purina).

El inóculo WSSV y la síntesis del RNA de doble cadena (dsRNA) fueron preparados como se describe anteriormente por (Hernandez-Palomares M.L.E. y col., 2018). Cada grupo experimental se inyectó vía intramuscular separándolos de la siguiente manera: a) solución salina como control (grupo SS, n=10), b) 100 μ L de inóculo WSSV (grupo WSSV, n=30), y c) 100 μ L de inóculo WSSV y 15 μ g de dsRNA HIF-1 α (grupo WSSV / dsRNA, n=30). Los tejidos (hepatopáncreas y músculo) se colectaron de la siguiente manera: grupo SS a las 24 h después del inicio del experimento; Grupo WSSV y WSSV / dsRNA, a las 24, 48 y 72 h después del tratamiento. A las 72 h no se colectaron tejidos del grupo WSSV debido a que la mortalidad era del 100%. Los tejidos fueron colocados en microtubos para inmediatamente ser congelados por inmersión en nitrógeno líquido y finalmente ser almacenados a -80 °C para su posterior uso.

Extracción de RNA total, digestión de DNA genómico y síntesis de cDNA

La extracción de RNA total (RNAt) se llevó a cabo homogeneizando 30-50 mg de hepatopáncreas y músculo con el reactivo TRIzol (Invitrogen), se adicionaron 100 μ L de cloroformo y se separaron las fases por centrifugación a 13,500g por 15 min a 4 °C.

Posteriormente, la fase acuosa superior se transfirió a un tubo nuevo, se agregaron 300µL de isopropanol al 100% frío y se centrifugó a 13,500 *g* por 20 min a 4 °C. El pellet formado se lavó con 500µL de etanol al 75% y finalmente se resuspendió en 50µL de agua libre de nucleasas. La concentración y pureza del RNAt se determinó por absorbancia a 260 y 280nm, y la integridad se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñidos con SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen).

Para eliminar la posible contaminación del RNAt con DNA genómico (gDNA), el RNAt fue tratado con el kit RQ1 RNEase-free DNase (Promega). Se tomaron 5 µg de RNAt y se adicionaron 2µL del buffer 10x RQ1 y 5µL de la enzima RQ1 RNase-free DNase, una vez mezclado esto, el volumen se llevó a 20µL adicionando agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC). Esta reacción se incubó a 37 °C por 30 min, y al finalizar se le agregó 2µL RQ1 DNase para detener la reacción y se incubó a 65 °C por 10 min.

La síntesis de DNA complementario (cDNA) se realizó a partir de cada RNAt libre de gDNA obtenido usando el kit GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega) y oligo dT. Se tomaron 5µg de RNAt libre de gDNA, se le adicionaron 1µL de Oligo dT (50µM) y se incubó a 70 °C durante 5 min. Una vez finalizada la incubación se agregaron 4µL de solución tamponada 5x provista por el kit, 3µL de MgCl₂, 1µL de dNTP (10mM) y 1µL de la enzima transcriptasa reversa. Posteriormente se incubó a 25 °C por 5 min, 42°C por 1h y finalmente a 70 °C por 15min para detener la reacción. Todos los cDNA fueron almacenados a -20°C hasta su posterior uso.

Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos específicos para cMnSOD, catalasa, GST, GPx y L8 fueron diseñados en base a secuencias nucleotídicas de sus homólogos de *L. vannamei* depositadas en el banco de genes GenBank (Tabla 1). Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizó el software Oligo Calc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) con las siguientes características: 1) longitud de 20-23 nucleótidos; 2) amplifican fragmentos de PCR de 100-250 pares de bases;

3) temperatura de alineación (T_m) de $\sim 60^\circ\text{C}$; 3) porcentajes de G-C de 55-60%; 4) no formen estructuras secundarias o dímeros de oligonucleótidos.

Cuantificación del mRNA para cMnSOD, catalasa, GST y GPx

La cuantificación del mRNA para cMnSOD, catalasa, GST y GPx se realizó mediante PCR cuantitativo (qPCR). Como estándar interno para normalizar la expresión de cada gen se utilizó el gen que codifica para la proteína L8. Para la realización de las curvas estándar de cada gen, primero se amplificó cada uno de los genes por PCR punto final. La mezcla de reacción estuvo compuesta de: 10 μL de la enzima PCR Supermix (Invitrogen), 1 μL de cada oligonucleótido (20 μM), 2 μL de cDNA y 6 μL de agua miliQ. Las condiciones del programa fueron las siguientes: 94°C por 3 minutos; seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 40 segundos y 72°C por 40 segundos; y finalmente 72°C por 7 minutos. Los amplicones obtenidos se purificaron utilizando el kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences). A partir de cada fragmento de PCR purificado se realizaron curvas de calibración usando diluciones seriadas de 5×10^{-3} a 5×10^{-8} ng/ μL .

El qPCR se realizó en un equipo Step-One Real-Time PCR system (Applied Biosystems), la mezcla de reacción estuvo compuesta de 7.5 μL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 5 μL de agua miliQ, 0.25 μL de cada oligonucleótido (20 μM) y 2 μL de cDNA (equivalente a 50 ng de RNA total). Las condiciones de amplificación y detección de los amplicones fueron las siguientes: 95°C por 10 min; 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto (40 ciclos) con una única medición de fluorescencia. Para la curva de disociación el programa utilizado fue: 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 min y 95°C por 15 segundos, subiendo de 60°C a 95°C , 0.3°C cada 20 segundos. La expresión de cada gen fue presentada como niveles de expresión relativa de cMnSOD, catalasa, GST y GPx entre L8.

Análisis estadístico

Se llevó a cabo por medio del programa Origin Pro 8, donde se probó la normalidad de cada grupo. Posteriormente, se analizaron las diferencias de cada grupo por medio del análisis de ANOVA, considerando como diferencia significativa aquellos grupos que presenten una diferencia de $p < 0.05$ respecto al grupo SS o control en la prueba post hoc de Bonferroni.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Amplificación y curvas estándar de cMnSOD, catalasa, GST, GPx

El estudio del RNAt por espectrofotometría y por electroforesis en gel de agarosa confirmo su integridad y pureza. La relación 260/280 nm obtenida por espectrofotometría fue de 1.98 ± 0.06 , lo cual indica que el RNAt se encuentra puro. La electroforesis en gel de agarosa muestra bandas definidas correspondientes al RNA ribosomal 28S y 18S, indicando que el RNAt se encuentra integro (Figura 2).

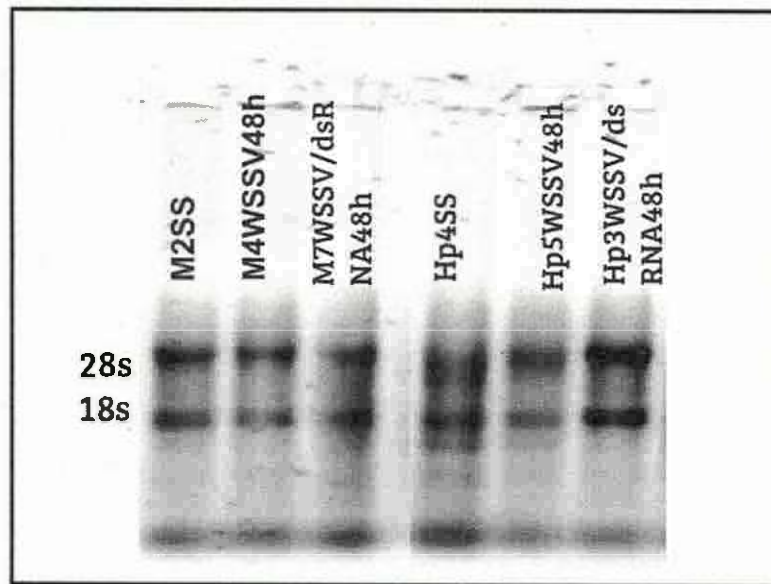


Figura 2. Análisis de integridad del RNAt extraído de músculo y hepatopáncreas. Gel de agarosa al 1% teñido con Syber safe. Donde M (músculo), Hp (hepatopáncreas) (donde 1, 2, 3, 4... representan el número de tejido), SS (grupo control), WSSV (grupo infectado), WSSV/dsRNA (grupo infectado con HIF-1 α silenciado) y horas de infección y silenciamiento; 24h, 48h y 72h.

Los productos de PCR utilizados para generar las curvas estándar amplificaron un fragmento de 266, 209, 274 y 181 pares de bases para GPx, cMnSOD, catalasa y GST, respectivamente (Figura 3). Por otro lado, la curva de disociación para cada uno de los genes amplificados por qPCR mostró un solo pico y una sola temperatura de disociación de 81.41 para cMnSOD, 87.07 para catalasa 89.02 para GST y 85.87 para GPX en el gráfico de la curva de disociación indicando la especificidad de los oligonucleótidos (Figura 4).

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos específicos para cMnSOD, catalasa, GST y GPx.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Número de acceso a GenBank
MnSODLvF1 MnSODLvR2	GGAAGCTTACATCTCCATCC GCATGAGCACCTCGTTCCTC	DQ005531.1
CatLvF1 CatLvR2	GCGTGACAAGTGTGCAGAGC GCTCCCTTAGCATGCACAACC	AY518322.1
GSTLvF1 GSTLvR2	CACGGGCACTGAGTTCGAGG CGTGCATGTCTGTCAGTTG	AY573381.2
GPxLvF1 GPxLvR2	CAACTTCGAGCCCAAGATGG CAACTTCGAGCCCAAGATGG	AY973252.2
L8F L8R	GCTGAGGGCATGTACTCTGG CCTGAAGGGAGCTTTACACG	DQ316258.1



Figura 3. Productos de PCR obtenidos a partir de cDNA de camarón blanco utilizados para realizar las curvas de calibración. Gel de agarosa al 1 % teñido con Sybr Safe. Marcador de peso molecular 1Kb Ladder.

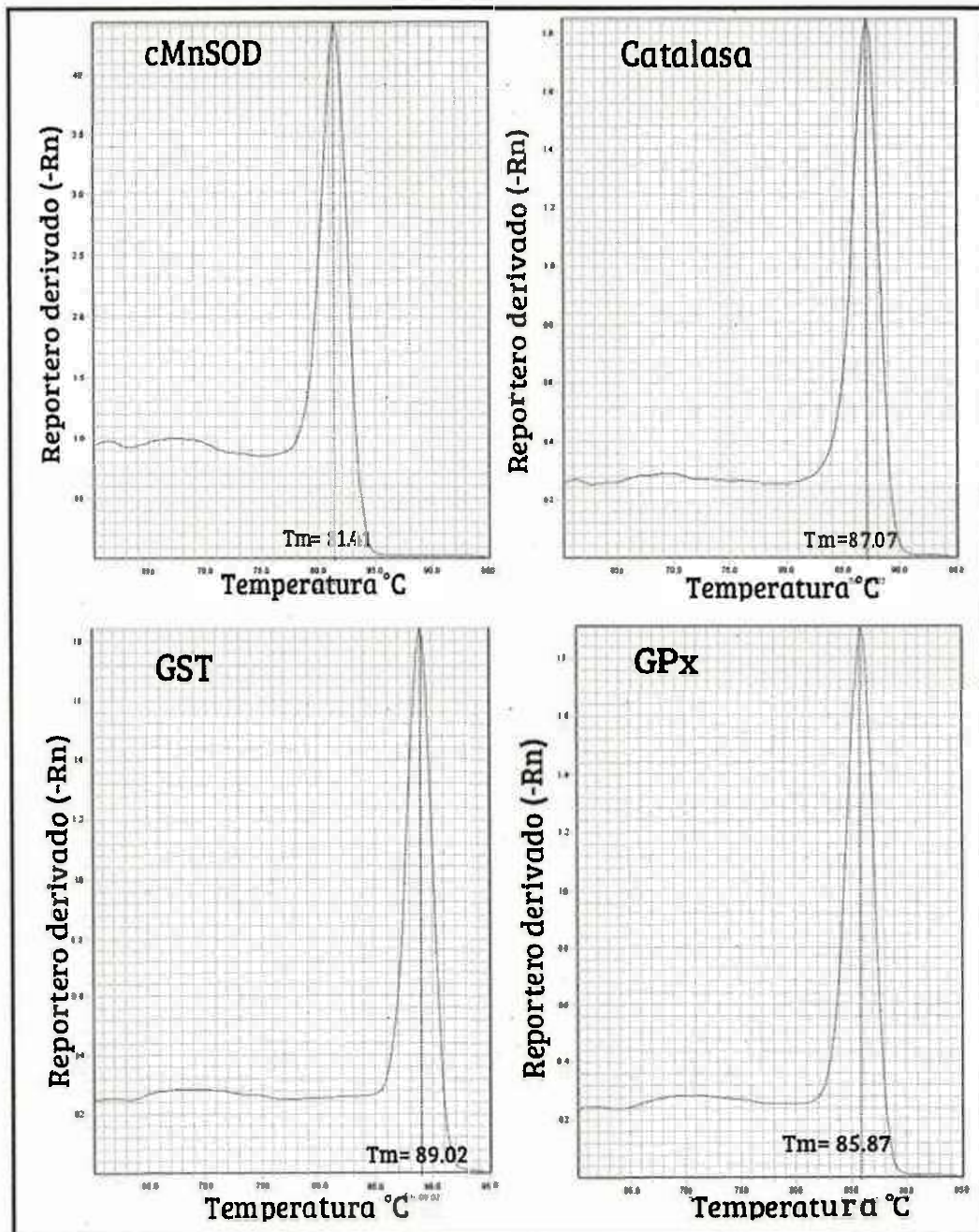


Figura 4. Diagrama de temperatura de disociación para los productos de: cMnSOD (81.41), catalasa (87.07), GST (89.02) y GPX (85.87) amplificados por qPCR. El único pico mostrado en el gráfico demuestra la amplificación específica de un solo fragmento de DNA.

Las curvas estándar para cada uno de los genes evaluados mostraron una eficiencia de amplificación promedio de 96%. Siendo que una eficiencia mayor al 100% indica la formación de dímeros de oligonucleótidos o amplicones no específicos, un mal pipeteo o el uso de pipetas mal calibradas (Figura 4) (Taylor S. y col., 2010). En base a que se obtuvo una eficiencia menor al 100% se demuestra la especificidad de los oligonucleótidos utilizados, así como la precisión y reproducibilidad del experimental.

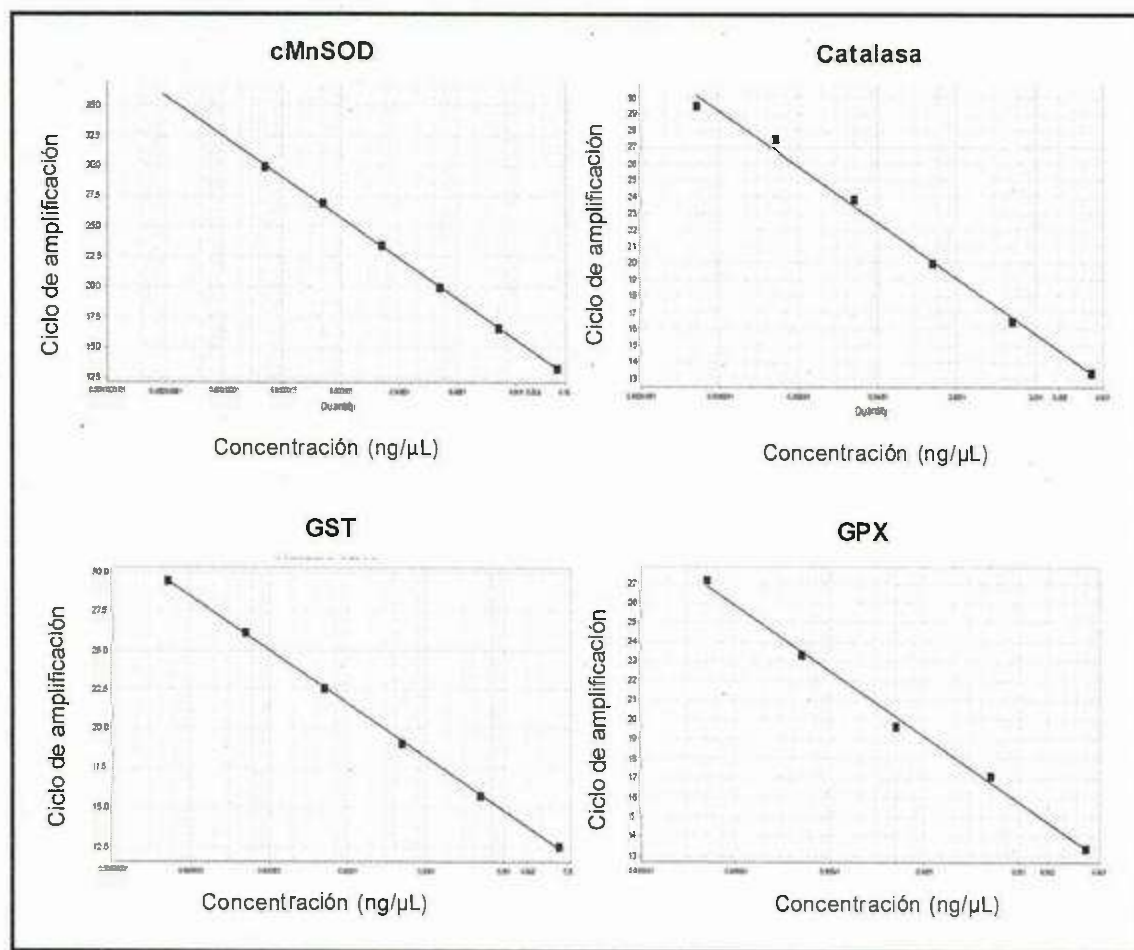
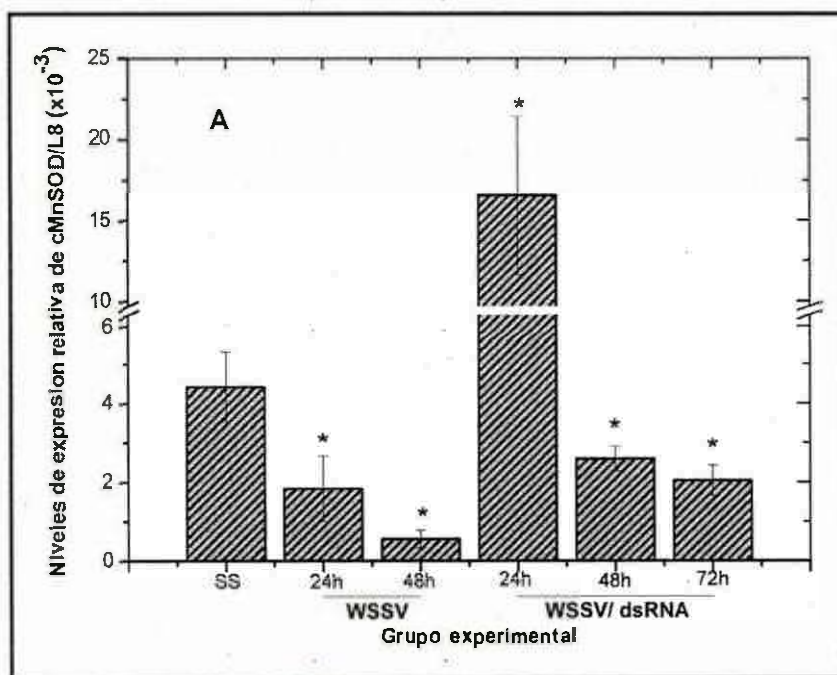


Figura 5. Curvas estándar utilizadas para la cuantificación del mRNA para cMnSOD, catalasa, GST y GPx. Los puntos en las gráficas muestran el ciclo de amplificación a la cual amplifico cada una de las concentraciones de la curva estándar.

Niveles de mRNA para cMnSOD, catalasa, GST y GPx

Los niveles de mRNA para cMnSOD disminuyeron 2 y 7 veces en hepatopáncreas del grupo WSSV a las 24 y 48 h pos-infección, respecto al control. En el grupo WSSV/dsRNA los niveles de cMnSOD aumentaron 4 veces a las 24 h pos-tratamiento respecto al control, pero disminuyeron 1.5 veces a las 48 y 72 h pos-tratamiento (Figura 6A). En músculo, los niveles de mRNA se mantuvieron a nivel basal a las 24 h, aumentando 2.3 veces en el grupo WSSV a las 48 h pos-infección comparado al control, mientras que en el grupo WSSV/dsRNA disminuyó 1.5 veces a las 24, 48 y 72h (Figura 6B).



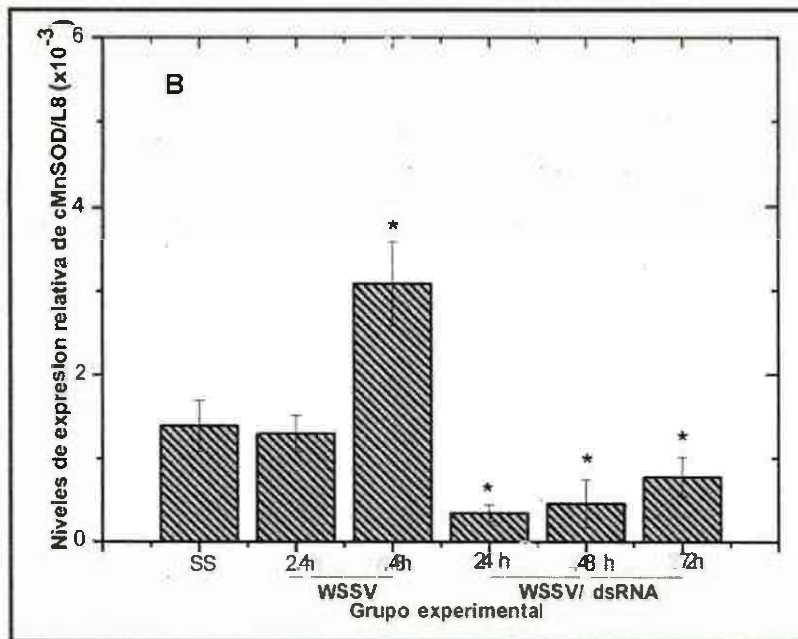


Figura 6. Niveles de expresión de cMnSOD en hepatopáncreas (A) y músculo (B) de camarones infectados con el WSSV y con HIF-1 α silenciado. Los asteriscos indican una diferencia significativa ($P < 0.05$) de cada uno de los grupos respecto al control.

Los niveles de mRNA para catalasa disminuyeron 7 y 30 veces en hepatopáncreas del grupo WSSV a las 24 y 48 h pos-infección, respectivamente, comparado al grupo control. En el grupo WSSV/dsRNA, los niveles de expresión de catalasa aumentaron 4 y 2 veces a las 24 y 48 h pos-tratamiento, respectivamente, comparados al control, mientras que disminuyeron a los niveles basales a las 72 h (Figura 7A). En músculo, los niveles de mRNA aumentaron 2.4 veces en el grupo WSSV a las 48 h pos-infección, mientras que en el grupo WSSV/dsRNA disminuyó 1.8 veces a las 24h, y aumentó 1.6 y 2.2 veces a las 48 y 72h, respectivamente, ambos comparados con el grupo control (Figura 7B).

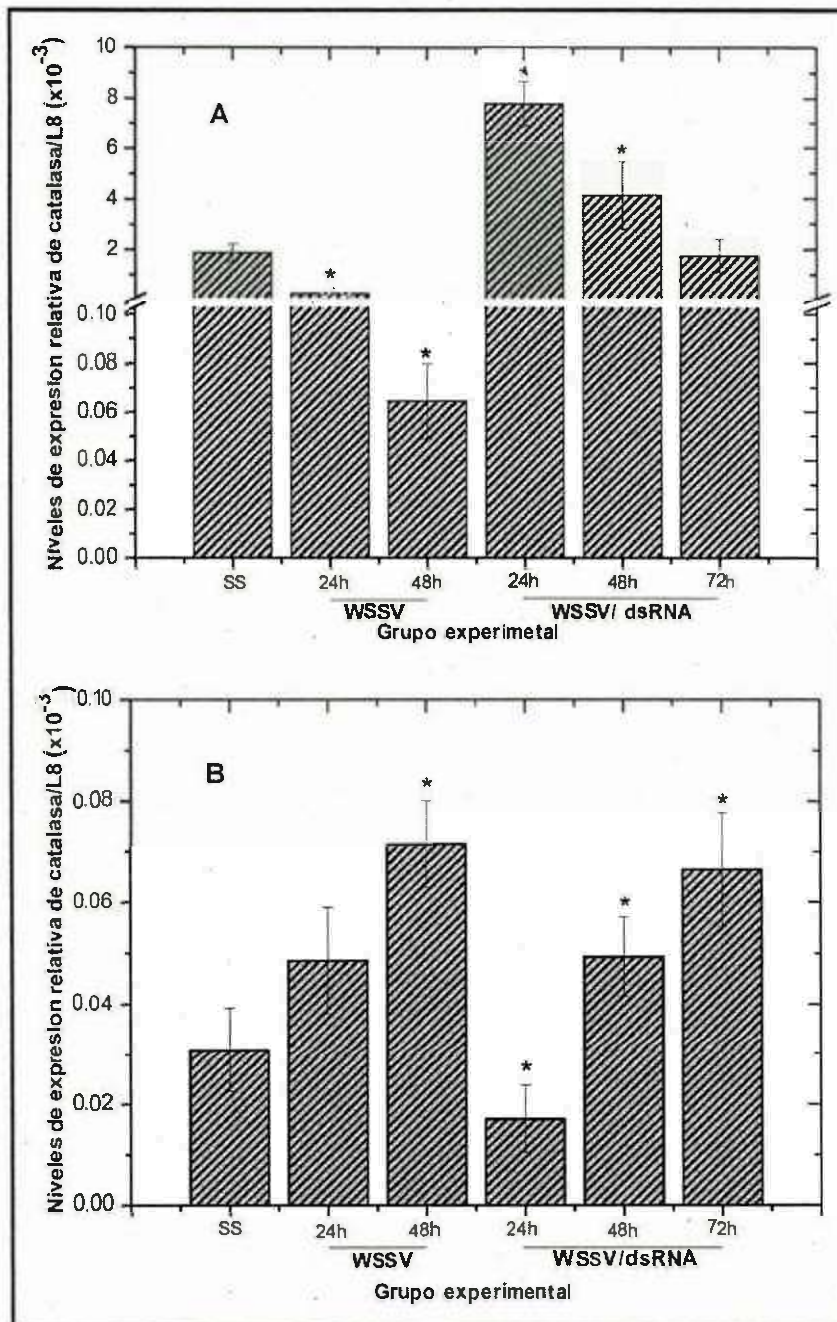
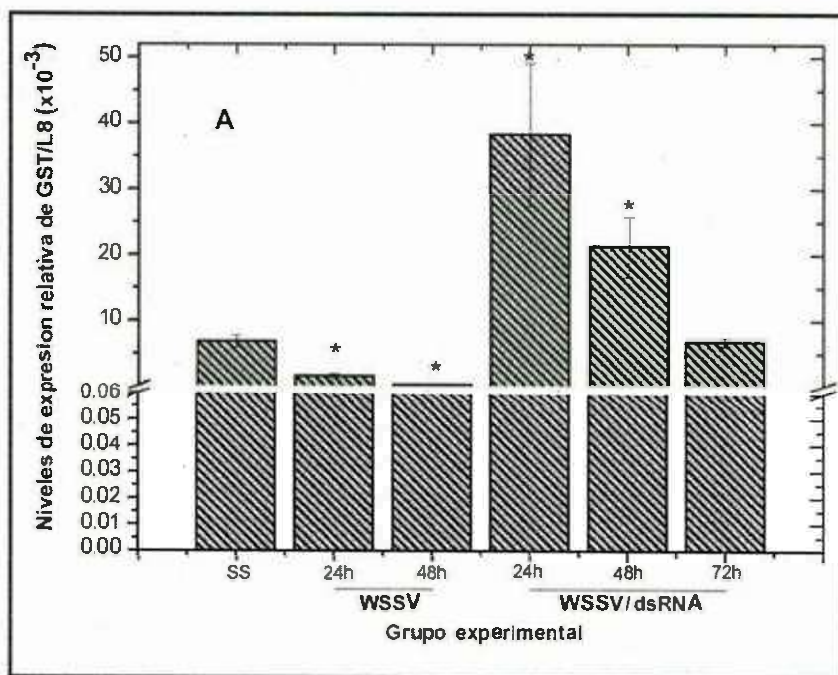


Figura 7. Niveles de expresión de catalasa en hepatopáncreas (A) y músculo (B) de camarones infectados con el WSSV y con HIF-1 α silenciado. Los asteriscos indican una diferencia significativa ($P < 0.05$) de cada uno de los grupos respecto al control.

Los niveles de mRNA para GST disminuyeron 4.3 y 30 veces en hepatopáncreas del grupo WSSV a las 24 y 48 h pos-infección, respectivamente, comparados al control. En contraste, en el grupo WSSV/dsRNA los niveles de mRNA para GST aumentaron 5.5 y 3 veces a las 24 y 48h post-tratamiento, respectivamente, comparado al control y disminuyendo a niveles similares al grupo control a las 72 h (Figura 8A). En músculo, los niveles de mRNA para GST disminuyeron 1.3 y 2.4 veces en el grupo WSSV a las 24 y 48 h pos-infección, respectivamente, respecto al grupo control, mientras que en el grupo WSSV/dsRNA disminuyó a 6, 1.5 y 1.8 veces a las 25, 48 y 72h pos-tratamiento, respectivamente (Figura 8B).



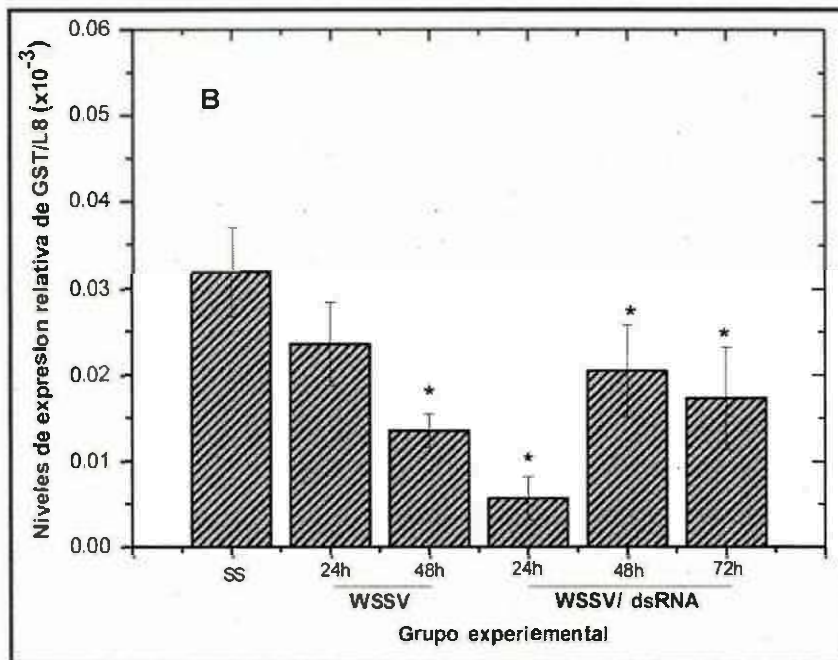


Figura 8. Niveles de expresión de GST en hepatopáncreas (A) y músculo (B) de camarones infectados con el WSSV y con HIF-1 α silenciado. Los asteriscos indican una diferencia significativa ($P < 0.05$) de cada uno de los grupos respecto al control.

Los niveles de mRNA para GPx en hepatopáncreas del grupo WSSV a las 24 y 48 h pos-infección no mostraron cambios significativos respecto al control, mientras que en el grupo WSSV/dsRNA aumentaron 5, 4,3 y 3 veces a las 24, 48 y 72 h pos-tratamiento, respectivamente (Figura 9A). En músculo, los niveles de mRNA para GPx disminuyeron 2.7 veces en el grupo WSSV a las 24h pos-infección respecto a los controles y aumentó a niveles basales a las 48 h, mientras que en el grupo WSSV/dsRNA disminuyeron 2.5, 1.5 y 1186 veces a las 24, 48 y 72 h pos-tratamiento, respectivamente, aumentando a niveles basales a las 72 h (Figura 9B).

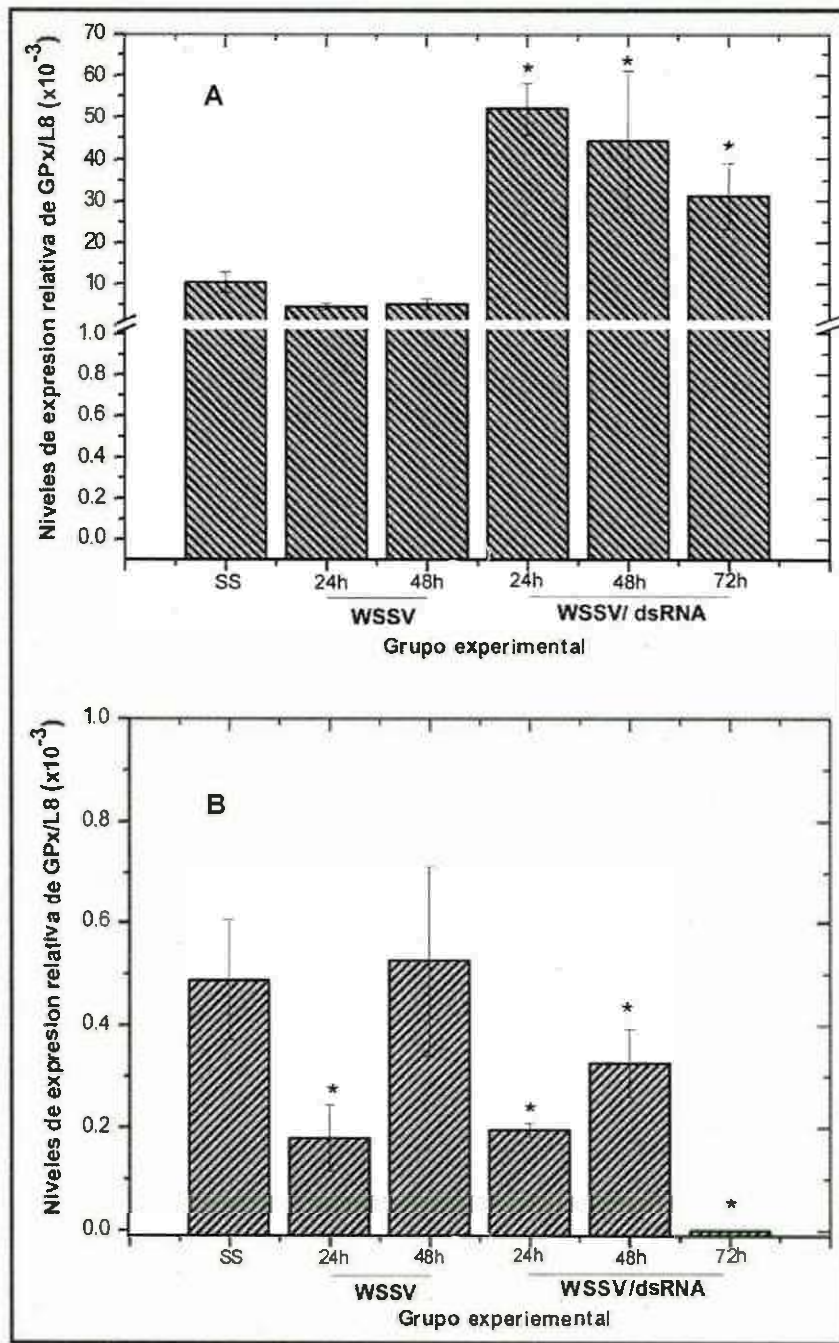


Figura 9. Niveles de expresión de GPx en hepatopáncreas (A) y músculo (B) de camarones infectados con el WSSV y con HIF-1 α silenciado. Los asteriscos indican una diferencia significativa ($P < 0.05$) de cada uno de los grupos respecto al control.

En diversos estudios describen que la expresión del mRNA de enzimas antioxidantes es regulada de manera tejido específica en camarones infectados con el WSSV. En hemocitos de camarón *Fenneropenaeus chinensis* aumenta la expresión de SOD manganeso mitocondrial (mMnSOD) a las 48h post-infección (Zhang Q. y col., 2007), mientras que la expresión de catalasa aumenta en las 14 y 37 h post infección en hemocitos y hepatopáncreas, respectivamente (Zhang Q. y col., 2008). En camarón *Exopalaemon carinacauda* la expresión de GST y GPx aumenta a las 3 y 6 h pos-infección en hemocitos y hepatopáncreas, respectivamente (Duan Y. y col., 2013), mientras que en hemocitos de *Penaeus monodon* GPx aumenta a las 48 h pos-infección (Kuan-Fu L. y col., 2010). En otros estudios, las actividades de GST, GPx, catalasa y SOD se encuentran disminuidas en hemolinfa y tejidos de *L. vannamei* (Parrilla-Taylor D.P. y col., 2013) y *P. monodon* (Mathew y col., 2007) a las 48 pos-infección con WSSV. En los estudios anteriores la disminución de la expresión y actividad de dichas enzimas condujo al camarón a estrés oxidativo, daño tisular, falla sistémica, hasta una muerte súbita. La expresión diferencial de los genes para enzimas antioxidantes se debe a la función del tejido evaluado. El hepatopáncreas contiene niveles elevados de ácidos grasos poliinsaturados, participa en la absorción, digestión y almacenamiento de nutrientes en camarones y es considerado importante en la producción de ROS; mientras que el músculo participa en la locomoción con capacidad glucolítica y gluconeogénica (Gibson R., 1979).

En estudios recientes, en camarón blanco se ha demostrado que el WSSV induce el efecto Warburg, una respuesta anormal de la glucólisis en donde aumenta el consumo de glucosa y acumulación de lactato, para satisfacer su replicación (Hernandez-Palomares M.L.E. y col., 2018). Chen y Col (2016) demostraron que la vía PI3K-Akt-mTOR, un activador de HIF-1 α en mamíferos (Chen I. T. y col., 2016; Su M.A. y col., 2014), induce el efecto Warburg en hemocitos de camarón blanco infectados con WSSV, con el fin de restablecer el equilibrio redox del huésped y contrarrestar la sobreproducción de ROS para así establecer su infección. Por otro lado, Soñanez-Organis y col (2011) sugieren que HIF-1 regula la glucólisis anaerobia en camarones sometidos a hipoxia mediante la inducción de genes glucolíticos claves. Además, el silenciamiento de HIF-1 α disminuyó la carga viral y mortalidad de los camarones junto con el daño oxidativo (proteínas carboniladas y peroxidación de lípidos) y aumento la actividad de enzimas antioxidantes en tejidos de camarón infectado con el WSSV (Miranda-Cruz MM. y col., "En revisión"). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el silenciamiento

de HIF-1 α contrarresta el daño oxidativo, debido a que se restauran las defensas antioxidantes, disminuyendo el daño oxidativo y mortalidad del camarón.

CONCLUSIÓN

La disminución en la expresión de genes antioxidantes producida por la infección con el WSSV, es contrarrestada por el silenciamiento de HIF-1 α de manera tejido-específica en las diferentes etapas de la infección.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre G., Valle F. 2000. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. *Developments in Microbiology*, 4, 333-348.
- Apel K., Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 55, 373-399.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*, 5(1), 9-19.
- Bray W.A., Lawrence A.L., Leung-Trujillo J.R. 1994. The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHHN virus, and salinity. *Aquaculture Digest*, 122, 133-146.
- Corona-Valenzuela J.C. 2016-2021. Programa de Mediano Plazo, Desarrollo Pesquero y Acuícola. SAGARHPA, 1-43.
- Cuéllar-Anjel J. 2013. Enfermedad de las manchas blancas; Síndrome de las manchas blancas. *The center for food security and public health*, 1-5.
- Chen I. T., Lee D. Y., Huang Y. T., Kou G. H., Wang H. C., Chang G. D., Lo C. F. 2016. Six Hours after Infection, the Metabolic Changes Induced by WSSV Neutralize the Host's Oxidative Stress Defenses. *Sci Rep*, 6, 27732.
- Chen I.T., Aoki T., Huang Y.T., Hirono I., Chen T.C., Huang J.Y., Chang G.D., Lo C.F., Wang H.C. 2011. White spot syndrome virus induces metabolic changes resembling the warburg effect in shrimp hemocytes in the early stage of infection. *J Virol*, 85(24), 12919-12928.
- Chen L.L., Leu J.H., Huang C.J., Chou C.M., Chen S.M., Wang C.H., Lo C.F., Kou G.H. 2002. Identification of a nucleocapsid protein (VP35) gene of shrimp white spot syndrome virus and characterization of the motif important for targeting VP35 to the nuclei of transfected insect cells. *Virology*, 293(1), 44-53.
- Díaz F., Farfán C., Sierra E., Re A.D. 2001. Effects of temperature and salinity fluctuation on the ammonium excretion and osmoregulation of juveniles of *Penaeus vannamei*, Boone. *Marine Freshwater Behavior and Physiology* 34, 93-104.

- Duan Y., Liu P., Li J., Chen P. 2013. Expression profiles of selenium dependent glutathione peroxidase and glutathione S-transferase from *Exopalaemon carinicauda* in response to *Vibrio anguillarum* and WSSV challenge. *Fish Shellfish Immunol*, 35(3), 661-670.
- Fedele AO, Whitelaw ML, Peet DJ. 2002. Regulation of gene expression by the hypoxia-inducible factors. *Mol Interv*, 2(4), 229-243.
- Foyer C.H., Noctor G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, 17(7), 1866-1875.
- Fridovich I. 2004. Mitochondria: are they the seat of senescence? *Aging cell*, 3(1), 13-16.
- Gibson R. BPL. 1979. The decapod hepatopancreas. *Oceanogr Mar Biol* 17, 285-346.
- Godínez-Siordia D.E., González-Ochoa O., Hernández-Díaz A. 2012. Major Shrimp pathogenic virus in America and their relationship with low salinity environments *Ra Ximhai*, 8(3), 61-69.
- Gómez-Anduro G. A., Barillas-Mury C.V., Peregrino-Uriarte A.B., Gupta L., Gollas-Galvan T., Hernandez-Lopez J., Yepiz-Plascencia G. 2006. The cytosolic manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: molecular cloning and expression. *Dev Comp Immunol*, 30(10), 893-900.
- Ha E.M., Oh C.T., Bae Y.S., Lee W. 2005. A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science*, 310(5749), 847-850.
- Halliwell B, Gutteridge J. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. *OXFORD, University press*, 105-245.
- Halliwell B. 2006. Especies reactivas y antioxidantes. La biología redox es un tema fundamental de la vida aeróbica. *Planta Physiol* 141, 312-322.
- Halliwell B., Gutteridge J.M. 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys*, 246(2), 501-514.
- Halliwell. B. G, J.M.C. 1989. Free Radicals in Biology and Medicine. (2).
- Hayes J.D., Pulford D.J. 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 30(6), 445-600.
- Hayes JD, Mantle TJ. 1986. Use of immuno-blot techniques to discriminate between the glutathione S-transferase Yf, Yk, Ya, Yn/Yb and Ye subunits and to study their distribution in extrahepatic tissues. *Biochemical* 233 (3), 779-788.

- Hernandez-Palomares M.L.E., Godoy-Lugo J.A., Gomez-Jimenez S., Gamez-Alejo L.A., Ortiz R.M., Munoz-Valle J.F., Peregrino-Uriarte A.B., Yepiz-Plascencia G., Rosas-Rodriguez J.A., Sonanez-Organis J.G. 2018. Regulation of lactate dehydrogenase in response to WSSV infection in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*, 74, 401-409.
- Katschinski D.M., Le L., Heinrich D., Wagner K.F., Hofer T., Schindler S.G., Wenger R.H. 2002. Heat induction of the unphosphorylated form of hypoxia-inducible factor-1 α is dependent on heat shock protein-90 activity. *Journal of Biological chemistry*, 277(11), 9262-9267.
- Kaushik D, Aryadeep R. 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *ENVIRONMENTAL SCIENCE*, 2, 1-13.
- Kuan-Fu L., Maw-Sheng Y., Guang-Hsiung K., Winton C., Chu-Fang L. 2010. Identification and cloning of a selenium-dependent glutathione peroxidase from tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and its transcription following pathogen infection and related to the molt stages. *Dev Comp Immunol*, 34(9), 935-944.
- Letelier ME, Martinez M, Gonzalez-Lira V, Faundez M, Aracena-Parks P. 2006. Inhibition of cytosolic glutathione S-transferase activity from rat liver by copper. *Chem Biol Interact*, 164(1-2), 39-48.
- Li C., Sun H., Chen A., Ning X., Wu H., Qin S., Xue Q., Zhao J. 2010. Identification and characterization of an intracellular Cu,Zn-superoxide dismutase (icCu/Zn-SOD) gene from clam *Venerupis philippinarum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(3), 499-503.
- Li Y., Wei L., Cao J., Qiu L., Jiang X., Li P., Song Q., Zhou H., Han Q., Diao X. 2016. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme activities in the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) when exposed to hypoxia and reoxygenation. *Chemosphere*, 144, 234-240.
- Liu K. F., Yeh M. S., Kou G. H., Cheng W, Lo C. F. 2010. Identification and cloning of a selenium-dependent glutathione peroxidase from tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and its transcription following pathogen infection and related to the molt stages. *Dev Comp Immunol*, 34(9), 935-944.
- Livingstone D.R. 2001. Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 41(8), 656-666.

- Lushchak V.I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 13-30.
- Mathew S, Kumar KA, Anandan R, Viswanathan Nair PG, Devadasan K. 2007. Changes in tissue defence system in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Penaeus monodon*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 145(3), 315-320.
- Menz A., Blake B.F. 1980. Experiments on the growth of *Penaeus vannamei* Boone. *Experimental Marine Biology and Ecology*, 48, 99-111.
- Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, Vanderauwera S, Van Breusegem F, Noctor G. 2010. Función de la catalasa en las plantas: un enfoque en los mutantes de *Arabidopsis* como modelos de imitación del estrés. *J. Exp. Bot*, 61(4), 4197-4220.
- Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R. 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ*, 33(4), 453-467.
- Miranda-Cruz MM, Poom-Llamas JJ, Godoy-Lugo JA, Morán-Palacio EF, Ortiz R, Rosas-Rodríguez JA, Soñanez-Organis JG. "En revisión". Silencing of HIF-1 in WSSV-infected white shrimp: effect on viral load and antioxidant enzymes *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Mittler R. 2002. Estrés oxidativo, antioxidantes y tolerancia al estrés. *trends in plant science*, 7(9), 405-410.
- Mohankumar K, Ramasamy P. 2006. White spot syndrome virus infection decreases the activity of antioxidant enzymes in *Fenneropenaeus indicus*. *Virus Res*, 115(1), 69-75.
- Mohankumar K, Ramasamy P. 2006. White spot syndrome virus infection decreases the activity of antioxidant enzymes in *Fenneropenaeus indicus*. *Virus Res*, 115(1), 69-75.
- Muñoz M, Cedeño R, Rodríguez J, vander Knaap W.P., Mialhe E, Bachère E. 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 191(1-3), 89-107.
- Muñoz M, Cedeño R, Rodríguez J, van der Knaap W, Mialhe E, Bachère E. 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 191(1-3), 89-107.
- Palazon A, Goldrath A.W, Nizet V, Johnson R.S. 2014. HIF transcription factors, inflammation, and immunity. *Immunity*, 41(4), 518-528.
- Parrilla-Taylor D.P., Zenteno-Savin T., Magallón-Barajas F.J. 2013. Antioxidant enzyme activity in pacific whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to infection with white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 380, 41-46.

- Ponce-Palafox J., Martínez-Palacios C.A., Ross L.G. 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp *Penaeus vannamei* Boone. *Aquaculture* 157, 107-115.
- Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. 2006. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*, 441(7092), 437-443.
- Rosenberry R. 1994. World Shrimp Farming. *Aquaculture Digest*, 52.
- SAGARHPA. 2016. Situación actual de la producción de camarón de acuicultura *Secretaría de Agricultura, Ganadería, Recursos Hidráulicos, Pesca y Acuicultura*.
- Sanchez-Paz A. 2010. White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. *Vet Res*, 41(6), 43.
- Semenza G. L. 2000. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* (1985), 88(4), 1474-1480.
- Semenza G.L. 2000. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* (1985), 88(4), 1474-1480.
- Semenza G.L. 2001. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol*, 13(2), 167-171.
- Semenza GL. 1998. Hypoxia-inducible factor 1 and the molecular physiology of oxygen homeostasis. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 131(3), 207-214.
- Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J*, 360(Pt 1), 1-16.
- Soñanez-Organis J.G., Peregrino-Uriarte A.B., Gomez-Jimenez S., Lopez-Zavala A., Forman H.J., Yepiz-Plascencia G. 2009. Molecular characterization of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and tissue-specific expression under hypoxia. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 150(3), 395-405.
- Soñanez-Organis J.G., Peregrino-Uriarte A.B., Sotelo-Mundo R.R., Forman H.J., Yepiz-Plascencia G. 2011. Hexokinase from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: cDNA sequence, structural protein model and regulation via HIF-1 in response to hypoxia. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 158(3), 242-249.
- Soñanez-Organis J.G., Rodríguez-Armenta M., Leal-Rubio B., Peregrino-Uriarte A.B., Gomez-Jimenez S., Yepiz-Plascencia G. 2012. Alternative splicing generates two lactate dehydrogenase subunits differentially expressed during hypoxia via HIF-1 in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Biochimie*, 94(5), 1250-1260.

- Su M.A., Huang Y.T., Chen I.T., D.Y. L, Hsieh Y.C., Li C.Y., Ng T.Z., Liang S.Y., Lin S.Y., Huang S.W. 2014. An invertebrate Warburg effect a shrimp virus achieves successful replication by altering the host metabolome via the PI3K-Akt-mTOR pathway. *PLoS Pathog*, 10(6), e1004196.
- Taylor S., Wakem M., Dijkman G., Alsarraj M., Nguyen M. 2010. A practical approach to RT-qPCR—publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*, 50(4), S1-S5.
- Télez-Castañeda M. 2016. Oportunidades de México en la camaronicultura (II). *El economista*.
- Tian J, Chen J, Jiang D, Liao S, Wang A. 2011. Transcriptional regulation of extracellular copper zinc superoxide dismutase from white shrimp *Litopenaeus vannamei* following *Vibrio alginolyticus* and WSSV infection. *Fish Shellfish Immunol*, 30(1), 234-240.
- Treece G.D. 2000. Shrimp culture. *aquaculture*, 798-868.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 160(1), 1-40.
- Van-Hulten M.C., Witteveldt J., Peters S., Kloosterboer N., Tarchini R., Fiers M., Sandbrink H., Lankhorst R.K., Vlak J.M. 2001. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology*, 286(1), 7-22.
- Wyban J., Walsh W.A., Godin D.M. 1995. Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture Digest*, 138, 267-279.
- Yang C., Liu S., Zhou S., Wu H., Yu J., C. X. 2011. Allelochemical ethyl 2-methyl acetoacetate (EMA) induces oxidative damage and antioxidant responses in *Phaeodactylum tricornutum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100(1), 93-103.
- Yang F., He J., Lin X., Li Q., Pan D., Zhang X., Xu X. 2001. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *J Virol*, 75(23), 11811-11820.
- Zhang, Marcillat, Giulivi, Ernster, Davies. 1990. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J Biol Chem*, 265(27), 16330-16336.
- Zhang L., Liu X., Chen L., You L., Pei D., Gong M., Zhao J., Li C., Liu D., Yu J., Wu H. 2011. Transcriptional regulation of selenium-dependent glutathione peroxidase from *Venerupis philippinarum* in response to pathogen and contaminants challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, 31(6), 831-837.
- Zhang P., Zhang X., Li J., Huang G. 2006. The effect of body weight, temperature, salinity, pH, light intensity and feeding condition on lethal DO levels of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 256, 579-587.

- Zhang Q., Huang J, Li F, Liu S, Liu Q, Wei J, Liang G, Xiang J. 2014. Molecular characterization, immune response against white spot syndrome virus infection of peroxiredoxin 4 in *Fenneropenaeus chinensis* and its antioxidant activity. *Fish Shellfish Immunol*, 37(1), 38-45.
- Zhang Q., Li F., Wang B., Zhang J., Liu Y., Zhou Q., Xiang J. 2007. The mitochondrial manganese superoxide dismutase gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*: cloning, distribution and expression. *Dev Comp Immunol*, 31(5), 429-440.
- Zhang Q., Li F., Zhang X., Dong B., Zhang J., Xie Y., Xiang J. 2008. cDNA cloning, characterization and expression analysis of the antioxidant enzyme gene, catalase, of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol*, 24(5), 584-591.
- Zhang Y., Marcillat O., Giulivi C. 1990. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J Biol Chem*, 265, 16330-16336.
- Zinkernagel A.S., Johnson R.S., Nizet V. 2007. Hypoxia inducible factor (HIF) function in innate immunity and infection. *J Mol Med (Berl)*, 85(12), 1339-1346.