



"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 ACTIVIDAD DE ENZIMAS  
ANTIOXIDANTES EN CAMARON BLANCO  
INFECTADO CON EL WSSV"

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO BIÓLOGO CLINICO

PRESENTA

*Melissa María Miranda Cruz*

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-1alfa sobre la actividad 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:

**Melissa María Miranda Cruz**

Navojoa, Sonora.

Junio del 2018

## APROBACIÓN

Los miembros del jurado asignado para revisar la tesis profesional de Melissa Maria Miranda Cruz, 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

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Edgar Felipe Morán Palacio**  
Vocal

  
\_\_\_\_\_  
**M.C. Luis Alberto Zamora Álvarez**  
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

Primeramente a Dios, porque nunca me soltó de su mano.

A la Universidad de Sonora, Unidad Regional Sur, a mis maestros, por sus enseñanzas tanto académicas como personales, y al personal que labora en dicha institución, gracias por su buena disposición.

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.

A mi tutor el Dr. José Guadalupe Soñanez Organis, por guiarme en el tiempo que he estado en el laboratorio, por su paciencia, sus enseñanzas, su confianza y su entrega en el trabajo, gracias por exigirme tanto.

Al Dr. Jesús Alfredo Rosas Rodríguez por apoyarme en todo momento de mi proyecto, por su disposición a explicarme durante mi estancia en el laboratorio y por impulsarme a siempre investigar más.

A mis sinodales Dr. Edgar Felipe Moran Palacio y MC. Luis Alberto Zamora Álvarez por el tiempo dedicado a mi proyecto.

## DEDICATORIA

A mi familia porque sin su apoyo esto no sería posible, gracias por su paciencia, sus consejos y por su amor siempre.

A José Alberto por ser mi compañero en ésta aventura, por apoyarme siempre en todo el proceso, por su amor y su ayuda en todo momento.

A mis amigos y compañeros del laboratorio que siempre estuvieron allí para mí.

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	5
<b>CONTENIDO</b> .....	6
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	8
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	9
<b>ANTECEDENTES</b> .....	11
Camarón blanco <i>Litopenaus vannamei</i> .....	11
Virus del síndrome de la mancha blanca.....	11
Especies reactivas de oxígeno .....	12
Mecanismos de respuesta antioxidante .....	12
Enzimas antioxidantes en camarón.....	14
HIF 1: Estructura y función .....	15
HIF 1 y respuesta antioxidante.....	15
HIF en camarón .....	16
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	18
<b>HIPÓTESIS</b> .....	19
<b>OBJETIVOS</b> .....	20
Objetivo General.....	20
Objetivos Específicos.....	20
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	21
Manejo de animales.....	21
Inyección del dsRNA e infección con el WSSV .....	21
Extracción y cuantificación de proteínas citoplasmáticas.....	22
Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes .....	23
Superóxido dismutasa.....	23
Catalasa.....	24
Glutación peroxidasa .....	24
Glutación S transferasa .....	25
Análisis Estadístico.....	26

<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>27</b>
Actividad específica de SOD.....	27
Actividad específica de catalasa.....	28
Actividad específica de GST.....	30
Actividad específica de GPx.....	31
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	<b>33</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>34</b>

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Fig		Página
1.	Actividad específica de SOD en músculo y hepatopáncreas de camarones infectados con el WSSV y con HIF-1 $\alpha$ silenciado.	27
2.	Actividad específica de catalasa en músculo y hepatopáncreas de camarones infectados con el WSSV y con HIF-1 $\alpha$ silenciado.	29
3.	Actividad específica de GST en músculo y hepatopáncreas de camarones infectados con el WSSV y con HIF-1 $\alpha$ silenciado.	30
4.	Actividad específica de GPx en músculo y hepatopáncreas de camarones infectados con el WSSV y con HIF-1 $\alpha$ silenciado.	31

---

## INTRODUCCIÓN

El camarón blanco *Litopenaeus vannamei* es el principal crustáceo cultivado en Sonora, y abarca gran parte de la economía del estado. Sin embargo, las infecciones virales son unos de los factores de riesgo que pueden afectar a la camaronicultura. El virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV, por sus siglas en inglés *White Spot Syndrome Virus*) es uno de los principales patógenos en camarón que causa un 100% de mortalidad en granjas camaroneras (Chen y col., 2011). El WSSV, entre otras alteraciones, induce la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, *Reactive Species Oxygen*), como un mecanismo de defensa del camarón en contra del virus (Schwarz, 1996).

La sobreproducción de ROS constituye un peligro para las células, las cuales contrarrestan estos compuestos por medio de sus mecanismos de defensa antioxidante (Hülya Bayır, 2005). Las defensas antioxidantes de las células incluyen diferentes enzimas que eliminan a las ROS, como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión S-transferasa (GST) (Blokchina y col., 2003; J. Nordberg y E. S. J. Arner, 2001; Valko y col., 2007). En camarones infectados con el WSSV, se ha demostrado que la actividad de la SOD, catalasa, GPx y GST depende del tiempo infección y del tejido evaluado (Parrilla-Taylor y col., 2013). En hemocitos de camarón blanco, las ROS producidas durante la infección con el WSSV son contrarrestadas mediante la regulación del efecto Warburg vía PI3K-Akt-mTOR (Chen et al 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, 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, 2000) y la respuesta inmune (Zinkernagel y col., 2007). HIF-1 consiste de una subunidad  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) regulada por oxígeno y una constitutiva subunidad  $\beta$  (HIF-1 $\beta$ ) (Semenza, 2001). En infecciones virales de mamíferos, HIF-1 $\alpha$  se induce en respuesta a una infección viral, sugiriendo que favorece al patógeno haciendo que la célula infectada sobreviva más tiempo (Palazon y col., 2014). En camarón blanco, HIF-1 regula la glucólisis anaerobia inducida por hipoxia mediante la activación de genes glucolíticos (Soñanez-Organis y col., 2011; Soñanez-Organis y col.,

2010; Soñanez-Organis y col., 2012), y estudios recientes sugieren que también regula la glucólisis inducida por el WSSV (Hernández-Palomares 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 y col., 2011). Las ROS son contrarrestadas por las enzimas antioxidantes, así como también por el efecto Warburg a través de la vía PI3K-Akt-mTOR (Chen y col., 2016), dicho efecto se caracteriza por un aumento en la glucólisis, la cual es regulada por HIF-1. Se ha demostrado que el silenciamiento de HIF-1 $\alpha$  disminuye la carga viral y mortalidad de camarones infectados con el WSSV, así como el daño oxidativo (Miranda-Cruz y Col. En revisión). Sin embargo, se desconoce si el silenciamiento de HIF-1 $\alpha$  activa la respuesta antioxidante enzimática para combatir las ROS generadas durante la infección con el WSSV. Por lo tanto, en éste trabajo se evaluó la actividad de las enzimas antioxidantes en camarones infectados con WSSV y con HIF-1 silenciado.

## ANTECEDENTES

### **Camarón blanco *Litopenaus vannamei***

El camarón es el producto marino más comercializado en el mundo, y el camarón blanco *L. vannamei* es el más cultivado no solo en América sino también en Asia (Liao y Chien, 2011). En el Noroeste de México, la camaronicultura se concreta principalmente en los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit, con una producción anual de hasta 100,000 toneladas (CONAPESCA, 2016).

El camarón tolera cambios de concentración de salinidad y oxígeno disuelto en agua durante su cultivo (Rosas y col., 1999), así como cambios de temperatura y pH (Allan y col., 1990). Sin embargo, la producción de camarón se ve afectada por enfermedades causadas por el virus de la cabeza amarilla (YHV), el virus del síndrome de taura (TSV) y el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), siendo este último el que provoca una alta tasa de mortalidad (Pascual y col., 2004).

#### **Virus del síndrome de la mancha blanca**

El síndrome de la mancha es una de las principales enfermedades del camarón en el mundo, causada por el WSSV. El virus puede causar el 100% de mortalidad acumulada entre los 2-10 días en granjas camarónicas, y hay una creciente preocupación por su introducción en la población de camarones silvestres. El WSSV contiene un DNA circular de doble cadena con un peso aproximado de 290 kpb (Chen y col., 2002; van Hulten y col., 2001; Yang y col., 2001). El comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) asignó al WSSV a la familia *Nimaviridae* como miembro único. Los viriones del WSSV son entre ovoides o elipsoides y baciliformes, miden 80 a 120 nm de diámetro y 250 a 380 nm de longitud (Lo y col., 2011).

Los síntomas que el WSSV causa sobre las diferentes especies de camarón son: pequeñas manchas blancas, que se deben a depósitos de sales de calcio, (0.5 – 3 mm) en el exoesqueleto y dentro de la epidermis, letargia, pérdida de apetito, decoloración rojiza y

perdida de la cutícula (Chou y col., 1995). Existen estudios relacionados con los genes y proteínas involucradas en la estructura, proliferación, ciclo de vida y latencia del WSSV (Durand y col., 1997; Wang y Zhang, 2008). Durante infecciones virales, como es la del WSSV en camarón, se producen especies reactivas de oxígeno (ROS), que son moléculas altamente reactivas e inestables, que forman parte importante de la defensa inmune del huésped contra el invasor (Schwarz, 1996; Valyi-Nagy y Dermody, 2005).

### **Especies reactivas de oxígeno**

Las ROS son moléculas pequeñas que tienen sitios con electrones desapareados, incluye al radical superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), peroxilo ( $RO_2$ ) e hidroperóxido ( $HO_2$ ) y agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) y ozono ( $O_3$ ). Dichas moléculas se producen en el metabolismo oxidativo normal y son involucradas en reacciones enzimáticas, mitocondriales, transporte de electrones, expresión génica, entre otros (Bayr, 2005).

La sobreproducción de ROS puede llevar a un daño oxidativo a la células, el daño puede ser a los lípidos (peroxidación lipídica), proteínas (oxidación de aminoácidos) y el ADN (mutaciones) (Fraga y col., 1990; Romero, 1994; Salvemini y Cuzzocrea, 2002). Por lo anterior, las células cuentan con mecanismo de defensa antioxidante que se encargan de eliminar o convertir a las ROS en compuestos no tóxicos (Nordberg y Arner, 2001).

### **Mecanismos de respuesta antioxidante**

Los mecanismos de defensa antioxidante consisten en una serie de enzimas y compuestos que mantienen el estado redox celular que es crítico para diversos procesos biológicos (Reddy, 2008). Las defensas antioxidantes incluyen diferentes moléculas orgánicas como glutatión, ácido ascórbico, vitamina A y E; y enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa (GPx), glutatión S- transferasa (GST), glutatión reductasa (GR) y tioredoxina (TRx) (Blokhina y col., 2003; Nordberg y Arner, 2001; Valko y col., 2007).

**SOD (EC 1.15.1.1):** Cataliza la dismutación de los radicales superóxidos. Es una de las principales enzimas de defensa antioxidante al estrés oxidativo, y existe una SOD con  $\text{Cu}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$  (CuZnSOD) en el sitio activo y otra con  $\text{Mn}^{+3}$  o  $\text{Fe}^{+3}$  en el centro catalítico (Fridovich, 1995) que pueden estar presentes en el citoplasma, mitocondria y extra celular (Marklund y col., 1982). El mecanismo de acción de la enzima es el siguiente:



**Catalasa (E.C.1.11.1.6):** Cataliza la disociación de  $2\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{O}_2$  y  $2\text{H}_2\text{O}$ . Aunque el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es el más estable de las especies de ROS, puede reaccionar con metales y producir el radical hidroxilo (OH), que es un ROS más perjudicial (Gutteridge, 1986; Thomas y col., 2009). Se han identificado tres grupos de catalasas: las monofuncionales, presentes en procariontas y eucariotas, las Mn-catalasas (manganeso en el sitio activo) solo presentes en procariontas y las catalasas peroxidadas, presentes en bacterias y hongos (Murshudov y col., 2002). El mecanismo de acción de la enzima es el siguiente:



**GST (EC 2.5.1.18):** Cataliza la transformación del ácido mercaptúrico, usando el glutatión (GSH) como sustrato, en un compuesto más soluble en agua y ácido clorhídrico (HCl). Es una familia de enzimas que utilizan glutatión (GSH) como un sustrato en las reacciones que permiten la biotransformación y eliminación de una amplia gama de compuestos exógenos y endógenos. Debido a sus similitudes en las secuencias de aminoácidos se han identificado diferentes isoformas en mamíferos ( $\alpha$ ,  $\pi$ ,  $\Omega$ ) (Hayes y Pulford, 1995; Sheehan y col., 2001), y en no mamíferos ( $\beta$ ,  $\lambda$ ) (Ding y col., 2003; Edwards y Dixon, 2004; Sheehan y col., 2001). El mecanismo de acción de la enzima es el siguiente:



CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenceno

GSDNB: 2,4-dinitrofenil- glutatión

**GPx (EC I. 11. 1.9):** Cataliza la reducción de hidroperóxidos con GSH como reductor (Tappel, 1978). GPx es una selenoproteína que participa en la desintoxicación de lípidos y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que se forman durante la fagocitosis o en los procesos físico-químicos de las células, con la oxidación del GSH (Brigelius-Flohe, 1999). En presencia de GPx, el glutatión, un donante de electrones, capta diversos radicales peróxidos (Arthur, 2000). Existen 4 isoformas de GPx las cuales son selenoproteínas y están presentes en la mayoría de las células (Ursini y col., 1995). El mecanismo de acción de la enzima es el siguiente:



GSSG: Glutatión disulfuro

### Enzimas antioxidantes en camarón

Estudios realizados en *Fenneropenaeus indicus* infectado con el WSSV, la infección del virus disminuye la actividad de SOD, catalasa y GPx en músculo y hepatopáncreas (Mohankumar y Ramasamy, 2006), mientras que en *Penaeus monodon* disminuye la actividad de SOD, catalasa y GST en hepatopáncreas (Mathew, yKumar, yAnandan, yViswanathan Nair, y y col., 2007). En *L. vannamei*, la actividad de SOD y GPx disminuye en hepatopáncreas, branquias y músculo de camarones infectados con el WSSV, mientras que en hemolinfa aumenta. También, catalasa aumenta en músculo, branquias y hepatopáncreas después de 24 y 48 horas de la infección con el WSSV, mientras que en hemolinfa disminuye (Parrilla-Taylor y col., 2013). Los estudios anteriores demuestran que la actividad de enzimas antioxidantes es tejido-específica y dependiente del tiempo de infección.

Por otro lado, estudios recientes demuestran que el WSSV induce el efecto Warburg, una respuesta anormal de la glucólisis, en hemocitos de camarones infectados a través de la vía la vía PI3K-Akt-mTOR (fosfatidilinositol 3 kinasa) para restaurar el equilibrio redox del huésped y así poder establecer la infección (Chen 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 (HIF-1) (Jiang y col., 2001).

### **HIF 1: Estructura y función.**

HIF-1 está compuesto por la subunidad HIF-1 $\alpha$  regulada por las concentraciones de oxígeno de la célula y la subunidad HIF-1 $\beta$  que se expresa constitutivamente (Semenza, 2001). HIF $\alpha$  tiene un dominio dependiente de oxígeno (ODD) que regula su estabilidad bajo condiciones normales de oxígeno (normoxia), en donde es hidroxilado por proli-1-hidroxilasas (PDH) provocando unión a la proteína von Hippel Lindau (pVHL) y posterior degradación vía el sistema ubiquitina-proteosoma (Fedele y col., 2002). En contraste, en condiciones de bajo oxígeno (hipoxia), la hidroxilación de HIF-1 $\alpha$  disminuye provocando su estabilización y translocación al núcleo donde se dimeriza con HIF-1 $\beta$  para realizar su función (Semenza, 2001). Una vez en el núcleo, HIF-1 se une a la secuencia consenso 5'-ACGTG-3' llamada elemento de respuesta a hipoxia (HRE), presente en cada uno de sus genes diana (Wenger y Gassmann, 1997).

HIF-1 regula la respuesta a hipoxia mediante la coordinación de un mecanismo transcripcional que asegura un óptimo funcionamiento metabólico, y de adaptación vascular a hipoxia (Semenza, 1998). HIF-1 induce la expresión de una gran variedad de genes que participan en la respuesta celular incluyendo la glucólisis, eritropoyesis y angiogénesis (Semenza, 2001).

### **HIF-1 y respuesta antioxidante**

Las ROS participan en la regulación de una variedad de procesos fisiológicos que permiten la supervivencia de la célula durante normoxia e hipoxia (Desireddi y col., 2010). Estudios sugieren que las ROS inducidas durante hipoxia regulan la actividad directa o indirectamente

de las PHD (prolil-hidroxilasas), que a su vez éstas regulan a HIF-1 (Guzy y col., 2007). Además, varios estudios relacionan la producción de ROS en la mitocondria con la activación de HIF-1 durante condiciones de hipoxia (Chandel y col., 2000; Guzy y col., 2007; Mansfield y col., 2005; Mansfield y col., 2004).

HIF-1 es regulado por las ROS durante inflamaciones ocurridas por infecciones virales o bacterianas a través de JunD, un regulador transcripcional de antioxidantes en mamíferos. JunD aumenta los niveles de genes antioxidantes y se ha visto, en células tumorales, que cuando la actividad del factor disminuye se da una mayor formación de ROS y esto refleja una estabilización de HIF-1 $\alpha$  (Gerald y col., 2004). Otro tipo de regulación sucede ya que las ROS oxidan Fe (II) en el sitio catalítico de las PHD, bloqueando su actividad y generando una acumulación de HIF-1 (Gerald y col., 2004). La siguiente regulación sucede cuando el ácido ascórbico reduce el Fe (II) en las PHD provocando la acumulación de HIF-1 $\alpha$  (Kaelin y Ratcliffe, 2008).

### **HIF en camarón**

En camarón blanco, se conoce que ambas subunidades de HIF-1 contienen los dominios importantes para la función y regulación de HIF-1, y que ambas subunidades son expresadas de manera tejido-específico durante normoxia e hipoxia (Soñanez-Organis y col., 2009). También se ha demostrado que HIF-1 regula la glucólisis anaerobia en camarones sometidos a hipoxia mediante la inducción de hexocinasa y lactato deshidrogenasa (LDH) (Soñanez-Organis y col., 2011; Soñanez-Organis y col., 2012).

Resultados obtenidos en 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 (Hernández-Palomares y col., 2018). En camarones infectados la glucólisis es aumentada por el efecto Warburg, el cual ayuda a contrarrestar a las ROS que se producen durante la infección (Chen y col., 2016). Existe evidencia que el silenciamiento de HIF-1 $\alpha$  disminuye la carga viral y mortalidad de camarones infectados con el WSSV, así como el daño oxidativo (proteínas carboniladas y peroxidación de lípidos) junto con un aumento tejido específico de la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes (Miranda-Cruz

y Col. En revisión). Sin embargo, la participación de HIF-1 sobre la respuesta antioxidante enzimática se desconoce en camarones infectados con el WSSV.

## JUSTIFICACIÓN

La camaronicultura es una de las principales fuentes económicas de nuestra región. Sin embargo, su producción se ve afectada por la infección por el WSSV, el cual estimula la producción de ROS como un mecanismo de defensa del camarón en contra del virus. En camarones infectados con el WSSV se ha demostrado que la actividad de enzimas antioxidantes es tejido-específica y dependiente del tiempo de infección. El WSSV contrarresta la producción de ROS y satisface su replicación a través de la regulación del efecto Warburg, una respuesta anormal de la glucólisis. En camarón blanco, HIF-1 regula la glucólisis inducida por el WSSV y su silenciamiento disminuye la carga viral y mortalidad de los camarones junto con el daño oxidativo en tejidos de camarón infectado. Sin embargo, no se ha demostrado si el silenciamiento de HIF-1 activa las enzimas antioxidantes de camarones infectados con el WSSV. Por lo tanto, este trabajo plantea determinar la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, catalasa, GPx y GST en tejidos de camarón *L. vannamei* infectados con el WSSV y con HIF-1 $\alpha$  silenciado.

## HIPÓTESIS

El silenciamiento de HIF-1 $\alpha$  aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, catalasa, GST y GPx en tejidos de camarón blanco infectado con WSSV.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Determinar el efecto del silenciamiento de HIF-1 $\alpha$  sobre la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, catalasa, GST y GPx en tejidos de camarón blanco infectado con el WSSV.

### **Objetivos Específicos**

- Extracción de proteínas citoplasmáticas de músculo y hepatopáncreas de camarón infectado con WSSV y con HIF-1 $\alpha$  silenciado.
- Determinar la actividad de las enzimas SOD, catalasa, GST y GPx en extractos de músculo y hepatopáncreas de camarón infectado con el WSSV y con HIF-1 $\alpha$  silenciado por medio de espectrofotometría.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Manejo de animales

Se utilizaron camarones juveniles de *L. vannamei* ( $14 \pm 2$  gr) libres de patógenos específicos (SPF, *Specific Pathogen Free*) proporcionados por una granja camaronera del estado de Sonora, México. Los camarones fueron trasladados 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 se aclimatarán 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).

### Inyección del dsRNA e infección con el WSSV

La síntesis del RNA de doble cadena (dsRNA) de HIF-1 $\alpha$  se realizó siguiendo la metodología descrita por (Soñanez-Organis y col., 2010), y se utilizó para inducir el mecanismo de RNA de interferencia para silenciar a HIF-1 $\alpha$ . Por otro lado la preparación del inóculo del WSSV se realizó en base a lo descrito por (Hernández-Palomares y col., 2018). Los camarones fueron divididos en los siguientes grupos: 1) controles, sin ningún reto experimental n=1; 2) inyectados con el inóculo del WSSV (WSSV), n=30; y 3) inyectados con el dsRNA HIF-1 $\alpha$  e inóculo del WSSV (WSSV/dsRNA),n=30.

Los camarones fueron inyectados intramuscularmente con 100  $\mu$ L de inóculo del WSSV para el grupo WSSV, mientras que para el grupo WSSV/dsRNA se inyectaron simultáneamente con 15  $\mu$ g de dsRNA HIF-1 $\alpha$  y 100  $\mu$ L de inóculo del WSSV. Después de 24, 48 y 72 horas post-inyección (grupo WSSV y WSSV/dsRNA) se tomó la mortalidad acumulativa y se colectaron diferentes tejidos (hepatopáncreas y músculo), en los camarones que

sobrevivieron. Los tejidos fueron colectados en microtubos para inmediatamente ser congelados por inmersión en nitrógeno líquido y finalmente ser almacenados a -80 °C para su posterior uso.

### **Extracción y cuantificación de proteínas citoplasmáticas**

Para evaluar la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, catalasa, GPx y GST se realizó la extracción de proteínas citoplasmáticas de músculo y hepatopáncreas utilizando el kit NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Pierce). Para evitar la degradación de las proteínas, se adicionó 1 µL de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma) y 1 µL de coctel inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich) por cada 100 µL de reactivo de extracción citoplasmática I (CER I). Así mismo al reactivo de extracción nuclear (NER) se le agregaron 1 µL del PMSF y 1 µL del coctel inhibidor de proteasas, mencionados anteriormente. Se homogenizaron ~20 mg de tejido en 100 µL de CER I en un POLYTRON PT 10-35 GT (Kinematica), posteriormente se incubó en hielo durante 10 min y se agregaron 5.5 µL de CER II para finalmente centrifugarlo por 5 min a 13,500 RPM y a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se almacenó a -80 °C.

La cuantificación de las proteínas se realizó usando el reactivo Quick Start Bradford (Bio-Rad) a partir de una dilución única (1:10, extracto: H<sub>2</sub>O) que fue dividida en dos alícuotas para su evaluación. Se hizo una mezcla del extracto citoplasmático con el reactivo Quick Start Bradford, se incubó 5 min a 25 °C y se midió la absorbancia a 595nm en el equipo Varioskan™ LUX multimode microplate reader (ThermoFisher).

## Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes

### Superóxido dismutasa

La actividad de SOD se determinó siguiendo la formación del radical superóxido ( $O_2^-$ ) mediante la reacción de xantina/xantina oxidasa y la reducción de nitro azul tetrazolio (NBT) como lo describió (Suzuki, 2000). Se realizó una solución de trabajo (50 mM de carbonato sódico, 0.1mM de xantina, 0.025 mM de NBT y 0.1mM de EDTA) y una solución de xantina oxidasa en 0.1 $\mu$ M de sulfato de amonio. En una celda se adicionó 490  $\mu$ L de solución de trabajo, 1 $\mu$ L de xantina oxidase y 10  $\mu$ L de extracto citoplasmático diluido 1:10 para músculo y 1:50 para hepatopáncreas. La reacción se siguió cinéticamente durante 5 minutos a 560 nm en el espectrofotómetro 6705 UV/Vis Spectrophotometer (Jenway). Después del tiempo transcurrido se anotó la pendiente de la línea recta obtenida al graficar absorbancia/tiempo, el siguiente paso fue calcular el porcentaje de inhibición utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{inhibición} = \frac{\left( \frac{\text{absorbancia}}{\text{minuto}} \text{ del blanco} \right) - \left( \frac{\text{absorbancia}}{\text{minuto}} \text{ de la muestra} \right)}{\frac{\text{absorbancia}}{\text{minuto}} \text{ del blanco}} \times 100$$

Teniendo el porcentaje de inhibición se calculó las unidades de la enzima teniendo en cuenta que una unidad (U) de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para inhibir la reacción de  $O_2^-$  con NBT en un 50%. La actividad específica de SOD se expresó en U SOD/ $\mu$ g de proteína.

## Catalasa

La actividad de la catalasa se midió utilizando el kit Catalase Assay Kit (Sigma-Aldrich) que sigue la reacción de la enzima con el metanol en presencia de  $H_2O_2$  produciendo formaldehído. El formaldehído se combina con el colorante 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole (Purpald), para poder ser cuantificado por espectrofotometría. Para lo anterior, primero se realizó una curva estándar de formaldehído con las siguientes concentraciones: 0, 5, 15, 30, 45, 60, 75  $\mu M$ . En una placa de 96 pozos se colocaron por separado 20  $\mu L$  de cada estándar de formaldehído, 20  $\mu L$  de control positivo (catalasa de hígado bovino) y 20  $\mu L$  de extracto citoplasmático (sin diluir para músculo y diluido 1:10 para hepatopáncreas) a los que se les adicionó 100  $\mu L$  de buffer de ensayo y 30  $\mu L$  de metanol. La reacción se inició agregando 20  $\mu L$  de  $H_2O_2$  a cada uno de los pozos y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo por la adición de 30  $\mu L$  de hidróxido de potasio, mientras que el formaldehído generado en la reacción se detectó por la adición de 30  $\mu L$  del cromógeno Catalase Purpald y 10  $\mu L$  de periodato de catalasa para finalmente medir la absorbancia a 540nm en el espectrofotómetro Varioskan™ LUX (Thermo Scientific). Para calcular la actividad de catalasa primeramente, se calculó la concentración de formaldehído en base a la curva estándar. Posteriormente, la actividad de catalasa se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad de Catalasa: } \frac{\text{Concentración de formaldehído en } \mu M}{20 \text{ min}} \times \text{la dilución de la muestra}$$

La actividad específica de catalasa se expresó en U/ $\mu g$  de proteína, en donde una unidad de catalasa se define como la cantidad de enzima que causa la formación de 1.0 nmol de formaldehído a una temperatura de 25°C.

## Glutación peroxidasa

La actividad de GPx se midió utilizando el kit Glutathione Peroxidase Assay Kit (Cayman Chemical) la cual se basa en la oxidación del glutatión, produciendo una reducción de

hidroperóxidos y por medio de NADPH y GR dar lugar a la formación de NADP<sup>+</sup>. En una placa de 96 pozos se colocaron 100 µL de buffer de ensayo, 50 µL de la mezcla de co-sustrato y 20 µL de las muestras de extractos citoplasmáticos de músculo y hepatopáncreas diluidos 1:50. Un control de referencia fue incluido mezclando 120 µL de buffer de ensayo, 50 µL del co-sustrato y 20 µL de la enzima GPx. Se inició la reacción con 20 µL de hidroperóxido de cumeno, y se midió la absorbancia a 340 nm durante 10 minutos en el equipo Varioskan™ LUX (Thermo Scientific). La actividad de GPx se calculó primeramente obteniendo la pendiente de la línea recta, a las cuales se les resta la pendiente del control de referencia y se calculó la actividad de GPx con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad GPx} \left( \frac{\text{nmol}}{\text{min} \cdot \text{mL}} \right) = \left( \frac{\frac{\Delta 340\text{nm}}{\text{min}}}{0.00373 \mu\text{M}^{-1}} \right) \left( \frac{0.19 \text{ mL}}{0.02 \text{ mL}} \right) \left( \text{Factor de Dilución} \right)$$

Teniendo la actividad de GPx en nmol/min/mL, lo siguiente fue dividir entre la concentración en µg/mL de la muestra y así obtener la actividad de GPx en nmol/µg de proteína. La actividad específica de GPx se representó como U/µg de proteína, teniendo en cuenta de una U de GPx es la cantidad de enzima que causa la oxidación de 1 nmol de NADPH a NAD por minuto a 25°C.

### Glutación S transferasa

La actividad de GST se cuantificó con el método de (Habig y Jakoby, 1981), el cual sigue la formación de tioéter - glutatión - dinitrobenzeno a partir de la reacción entre glutatión y 1 - cloro 2,4 - dinitrobenzeno (CDNB). Se utilizó una solución de trabajo (100 mM de buffer de fosfatos pH 7, 60 mM de EDTA pH 10, 10mM de CDMB), glutatión 10mM y muestra o blanco. Se colocó en la celda 459 µL de solución de trabajo, 25 µL de glutatión y 16 µL de muestra de extracto citoplasmático sin diluir de músculo y hepatopáncreas, el blanco fue la solución de trabajo. La reacción se siguió cinéticamente por 6 minutos a 340 nm en el espectrofotómetro 6705 UV/Vis

Spectrophotometer (Jenway). Después del tiempo transcurrido se anotó la pendiente de la línea recta en absorbancia/minuto y se utilizó la siguiente fórmula para calcular las U/ml de enzima:

$$\frac{U}{mL} \text{ de enzima} = \frac{(\Delta Abs \text{ 340nm/min muestra} - \Delta Abs \text{ 340nm/min blanco}) (0.5)(\text{factor de dilución})}{9.6(0.016)}$$

En donde:

0.5= indica el volumen total en mL.

9.6= indica el coeficiente de extinción molar del CDNB a 340nm.

0.016= indica el volumen de muestra utilizado en mL.

La actividad específica de GST se representó como U/ $\mu$ g de proteína en donde una U se define como la cantidad de enzima que sintetiza 1  $\mu$ mol de CDNB con glutatión reducido por  $\text{min}^{-1}$  a 25°C.

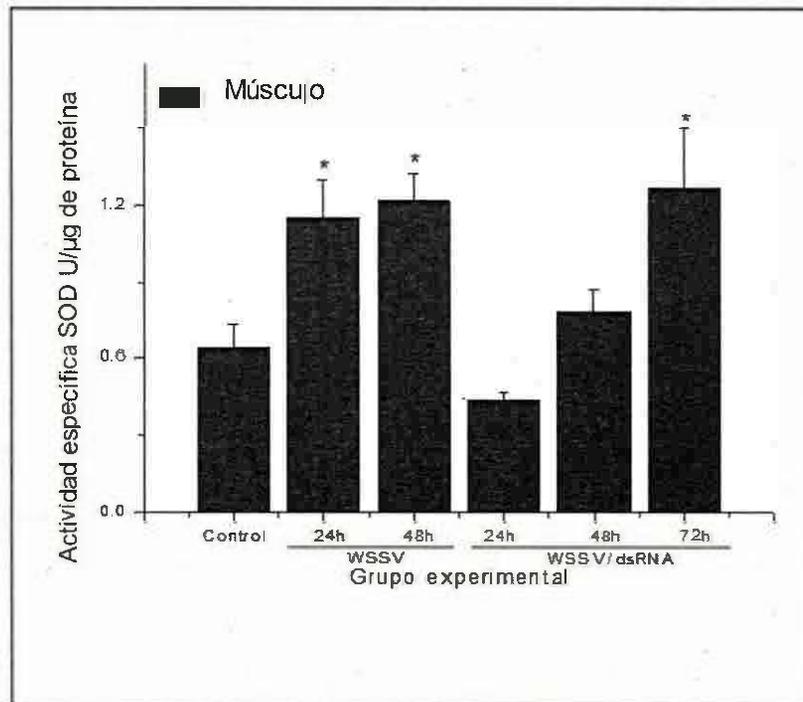
### **Análisis Estadístico**

Se utilizó un diseño estadístico completamente al azar y los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA). Para verificar la normalidad, los datos se sometieron a la prueba de Kolmogorov-Smirnov y para evaluar diferencias entre el control y cada uno de los tratamientos se usó la prueba de comparación múltiple de Duncan a un nivel de probabilidad del 95% mediante el programa Origin Pro 8.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Actividad específica de SOD

La actividad de SOD aumentó 1.79 y 1.89 veces en músculo del grupo WSSV a las 24 y 48 h pos-infección, respectivamente, respecto al control. En el caso del grupo WSSV/dsRNA no hubo cambios significativos de la actividad de SOD a las 24 y 48 h pos-infección respecto al control, mientras que a las 72 h aumentó 2 veces. En hepatopáncreas, la actividad de SOD aumento 2.51 y 2 veces en el grupo WSSV a las 24 y 48 h pos-infección, respectivamente, comparado al control. En el grupo del WSSV/dsRNA, la actividad de SOD aumentó 2.51 veces a las 24 h pos-infección, mientras que a las 48 y 72 h aumentó 1.15 veces (Figura 1).



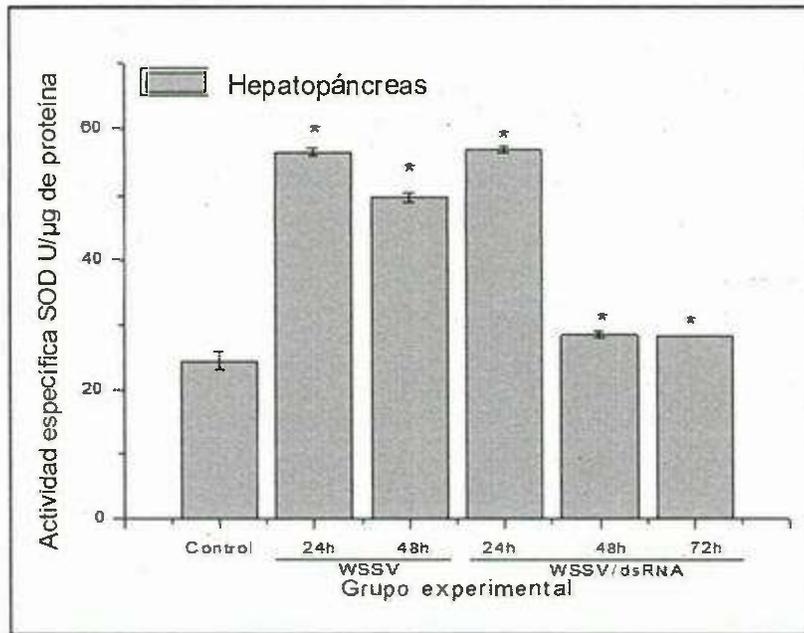


Figura 1: Actividad específica de SOD en músculo y hepatopáncreas de camarones infectados con el WSSV y HIF-1 $\alpha$  silenciado. Los asteriscos denotan cambios significativos ( $P<0.05$ ) respecto al control. Grupo control, WSSV: grupo infectado, WSSV/dsRNA: grupo infectados y con HIF-1 $\alpha$  silenciado.

#### Actividad específica de catalasa

En músculo, la actividad de catalasa aumento 1.54 y 1.63 veces en el grupo WSSV a las 24 y 48 h pos-infección, respectivamente, con respecto al control, mientras que en el grupo WSSV/dsRNA aumentó 1.8, 1.5 y 2.5 veces a las 24, 48 y 72 h, respectivamente, en comparación al control. La actividad de catalasa en hepatopáncreas no mostró diferencia significativa entre el grupo WSSV a las 24 y 48 h pos-infección con respecto control. En el grupo WSSV/dsRNA, la actividad de catalasa disminuyó 2, 2.42 y 2.73 veces a las 24, 48 y 72 h, respectivamente, en comparación al control. (Figura 2).

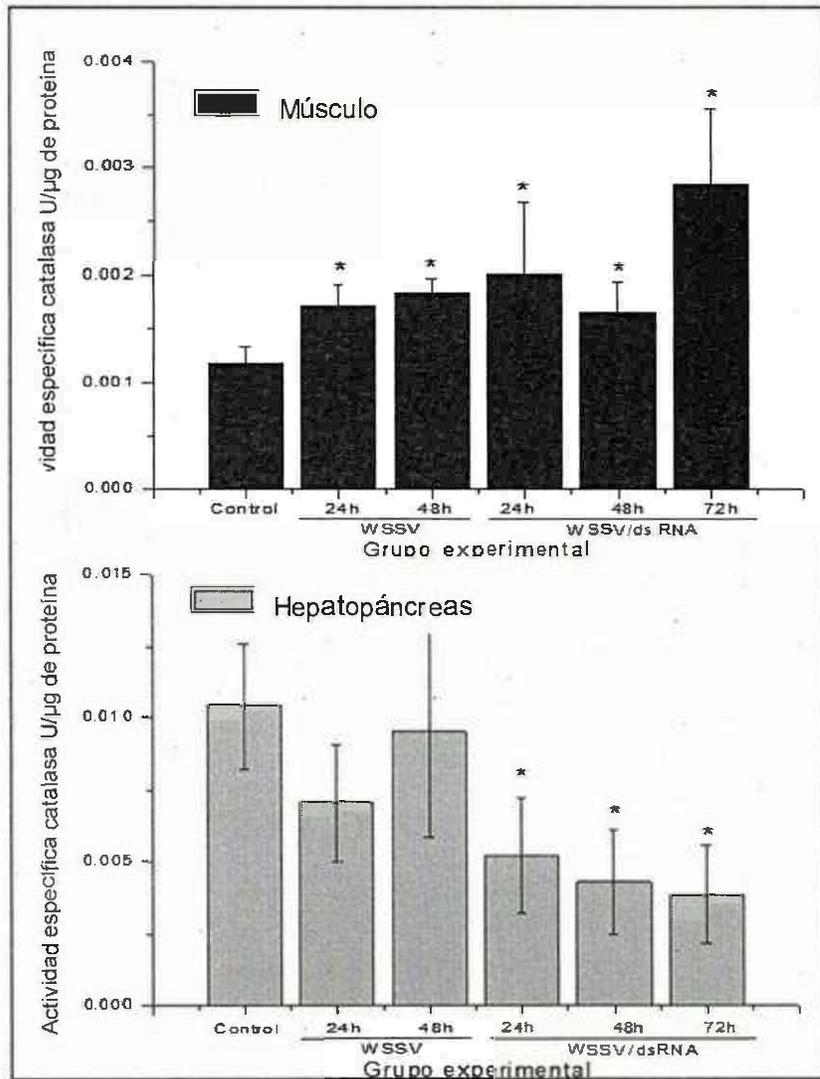


Figura 2: Actividad específica de catalasa en músculo y hepatopáncreas de camarones infectados con el WSSV y HIF-1 $\alpha$  silenciado. Los asteriscos denotan cambios significativos ( $P < 0.05$ ) respecto al control. Grupo control, WSSV: grupo infectado, WSSV/dsRNA: grupo infectados y con HIF-1 $\alpha$  silenciado.

### Actividad específica de GST

En músculo, la actividad de GST disminuyó 1.45 y 1.43 veces en el grupo WSSV a las 24 y 48 h pos-infección, respectivamente, respecto al control, mientras que en el grupo WSSV/dsRNA aumentó 2.77 veces a las 72 h pos-tratamiento. La actividad de GST aumentó 1.1 veces en hepatopáncreas del grupo WSSV a las 24 h pos-infección respecto al control, mientras que a las 48 h disminuyó 2.2 veces. En el grupo WSSV/dsRNA, la actividad de GST disminuyó 1.2 veces a las 24, 48 y 72 h respecto al control. (Figura 3).

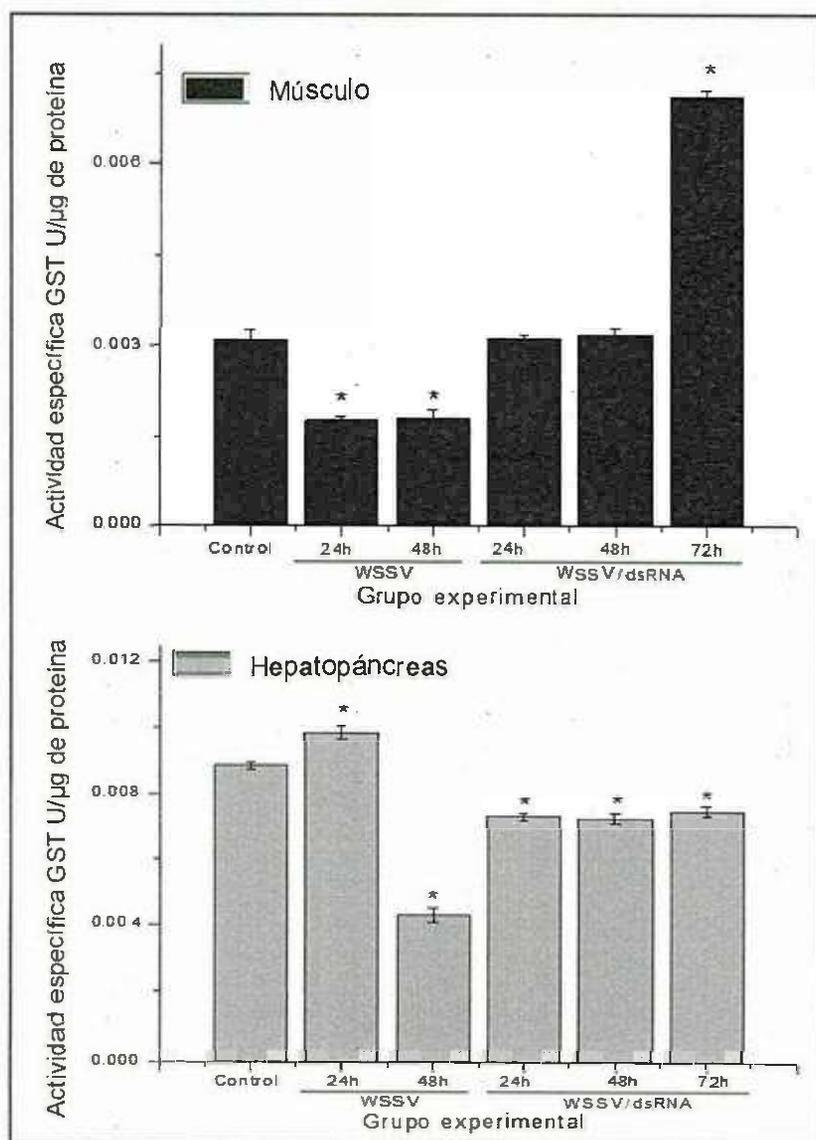


Fig 3: Actividad específica de GST en músculo y hepatopáncreas de camarones infectados con el WSSV y HIF-1 $\alpha$  silenciado. Los asteriscos denotan cambios significativos ( $P < 0.05$ ) respecto al control. Grupo control, WSSV: grupo infectado, WSSV/dsRNA: grupo infectados y con HIF-1 silenciado.

#### Actividad específica de GPx

La actividad de GPx en hepatopáncreas disminuyó 1.6 veces en el grupo WSSV a las 48 h pos-infección respecto al control, mientras que el grupo WSSV/dsRNA disminuyó 2.5 y 2.2 veces a las 48 y 72 h pos-tratamiento (Figura 4). En contraste, la actividad de GPx no se detectó en ninguno de los grupos experimentales a los diferentes tiempos de la infección.

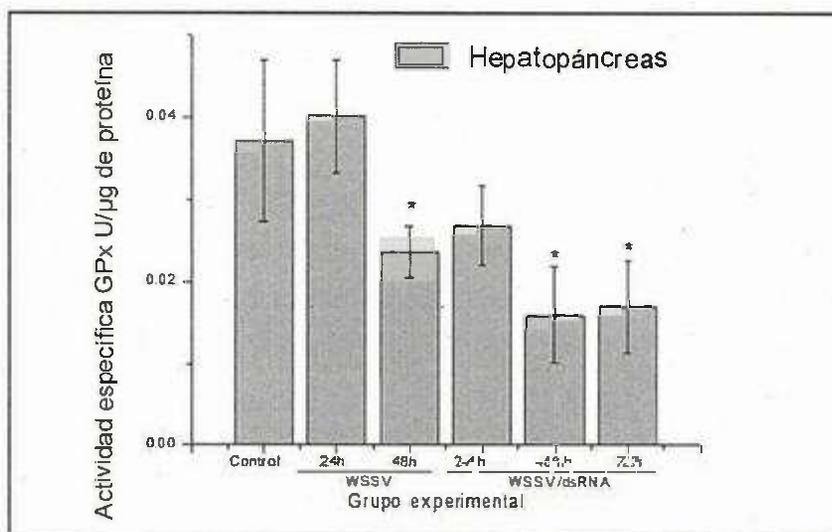


Fig 4: Actividad específica de GPx en hepatopáncreas de camarones infectados con el WSSV y HIF-1 $\alpha$  silenciado. Los asteriscos denotan cambios significativos ( $P < 0.05$ ) respecto al control. Grupo control, WSSV: grupo infectado, WSSV/dsRNA: grupo infectados y con HIF-1 silenciado.

Estudios realizados en *F. indicus*, *P. monodon* y *L. vannamei* infectado con el WSSV se observó que la actividad de SOD, GST y GPx aumenta en hepatopáncreas a las 24 h de la infección mientras que a las 48 h disminuye provocando estrés oxidativo (Mathew, yKumar, yAnandan, yNair, y y col., 2007; Parrilla-Taylor y col., 2013; Subramanian, 2013). Estudios en *F. indicus* realizados por Mohankumar y Ramasamy en el 2009 demuestran que el WSSV disminuye la actividad de GST y catalasa en músculo y hepatopáncreas, respectivamente, conforme al tiempo de infección. Mathew y colaboradores en el 2007 demuestran un aumento de la actividad de catalasa en músculo *P. monodon* en las primeras etapas de la infección con el WSSV. En los estudios anteriores la disminución en la actividad de enzimas antioxidantes generó estrés oxidativo, daño tisular, falla sistémica, hasta conducir al camarón a una muerte súbita. Además, se sugiere que la actividad diferencial de las enzimas antioxidantes puede estar relacionada con la función del tejido evaluado. El hepatopáncreas contiene niveles elevados de ácidos grasos, 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 camarón blanco, el WSSV también produce cambios en el metabolismo energético a través de la inducción del efecto Warburg, una respuesta anormal de la glucólisis en donde aumenta el consumo de glucosa y acumulación de lactato, para satisfacer su replicación. Chen y col 2016, demostraron que la vía la vía PI3K-Akt-mTOR, un activador de HIF-1 $\alpha$  en mamíferos, induce el efecto Warburg en hemocitos de camarón blanco con el fin de restablecer el equilibrio redox del huésped y contrarrestar la sobreproducción de ROS para así establecer su infección (Chen y col., 2016). Un estudio reciente por nuestro grupo de trabajo sugiere que el efecto Warburg inducido por el WSSV es mediado por HIF-1 en tejidos de camarón blanco infectado (Hemández-Palomares y col., 2018). Además, el silenciamiento de HIF-1 $\alpha$  disminuyó la carga viral y mortalidad de los camarones junto con el daño oxidativo (proteínas carboniladas y peroxidación de lípidos) en tejidos de camarón infectado con el WSSV (Miranda-Cruz MM. y col.). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el silenciamiento de HIF-1 $\alpha$  contrarresta el daño oxidativo, debido a que se restauran las defensas antioxidantes, disminuyendo el daño oxidativo y mortalidad del camarón.

## CONCLUSIÓN

El silenciamiento de HIF-1 $\alpha$  aumenta la actividad de SOD, catalasa y GST de manera tejido-específica en camarones infectados con el WSSV, sugiriendo que contrarresta el daño oxidativo a través de la regulación del efecto Warburg.

## BIBLIOGRAFÍA

- Allan GL, Maguire GB, Hopkins SJ. 1990. Acute and Chronic Toxicity of Ammonia to Juvenile *Metapenaeus-Macleayi* and *Penaeus-Monodon* and the Influence of Low Dissolved-Oxygen Levels. *Aquaculture*, 91(3-4), 265-280.
- Arthur JR. 2000. The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci*, 57(13-14), 1825-1835.
- Bayr H. 2005. Reactive oxygen species. *Critical care medicine*, 33(12), S498-S501.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91(2), 179-194.
- Brigelius-Flohe R. 1999. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med*, 27(9-10), 951-965.
- CONAPESCA. (2016). Anuario estadístico de acuicultura y pesca. *Comisión nacional de acuicultura y pesca*, from [www.conapesca.gob.mx](http://www.conapesca.gob.mx)
- Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT. 2000. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  during hypoxia a mechanism of O<sub>2</sub> sensing. *Journal of Biological Chemistry*, 275(33), 25130-25138.
- Chen, Aoki T, Huang YT, Hirono I, Chen TC, Huang JY, Chang GD, Lo CF, Wang HC. 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, 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. *Scientific reports*, 6, 27732.
- Chen, Leu JH, Huang CJ, Chou CM, Chen SM, Wang CH, Lo CF, Kou GH. 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.
- Chou H, Huang C, Wang C, Chiang H, Lo C. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Diseases of aquatic organisms*, 23(3), 165-173.
- Desireddi JR, Farrow KN, Marks JD, Waypa GB, Schumacker PT. 2010. Hypoxia increases ROS signaling and cytosolic Ca<sup>2+</sup> in pulmonary artery smooth muscle cells of mouse lungs slices. *Antioxidants & redox signaling*, 12(5), 595-602.

- Ding Y, Ortellì F, Rossiter LC, Hemingway J, Ranson H. 2003. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *BMC genomics*, 4(1), 35.
- Durand S, Lightner DV, Redman RM, Bonami JR. 1997. Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus (WSSV). *Diseases of aquatic organisms*, 29(3), 205-211.
- Edwards R, Dixon DP. (2004). Metabolism of natural and xenobiotic substrates by the plant glutathione S-transferase superfamily *Molecular Ecotoxicology of Plants* (pp. 17-50): Springer.
- Fedele AO, Whitelaw ML, Peet DJ. 2002. Regulation of gene expression by the hypoxia-inducible factors. *Mol Interv*, 2(4), 229-243.
- Fraga CG, Shigenaga MK, Park J-W, Degan P, Ames BN. 1990. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4533-4537.
- Fridovich I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*, 64, 97-112.
- Gerald D, Berra E, Frapart YM, Chan DA, Giaccia AJ, Mansuy D, Pouyssegur J, Yaniv M, Mechta-Grigoriou F. 2004. JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell*, 118(6), 781-794.
- Gibson R. BPL. 1979. The decapod hepatopancreas. *Oceanogr Mar Biol* 17, 285-346.
- Gutteridge JMC. 1986. Iron Promoters of the Fenton Reaction and Lipid-Peroxidation Can Be Released from Hemoglobin by Peroxides. *FEBS Lett*, 201(2), 291-295.
- Guzy RD, Mack MM, Schumacker PT. 2007. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and gene transcription in yeast. *Antioxidants & redox signaling*, 9(9), 1317-1328.
- Habig WH, Jakoby WB. 1981. Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol*, 77, 218-231.
- Hayes JD, Pulford DJ. 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.
- Hernández-Palomares MLE, Godoy-Lugo JA, Gomez-Jimenez S, Gamez-Alejo LA, Ortiz RM, Munoz-Valle JF, Peregrino-Uriarte AB, Yepiz-Plascencia G, Rosas-Rodriguez JA, Sonanez-Organis JG. 2018. Regulation of lactate dehydrogenase in response to WSSV infection in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*, 74, 401-409.

- Hülya Bayır M. 2005. Reactive oxygen species. *Crit Care Med*, 33.
- Jiang B-H, Jiang G, Zheng JZ, Lu Z, Hunter T, Vogt PK. 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth and Differentiation-Publication American Association for Cancer Research*, 12(7), 363-370.
- Kaelin WG, Jr., Ratcliffe PJ. 2008. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*, 30(4), 393-402.
- Liao IC, Chien Y-H. (2011). The Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in Asia: The World's Most Widely Cultured Alien Crustacean *In the Wrong Place-Alien Marine Crustaceans: Distribution, Biology and Impacts* (pp. 489-519): Springer.
- Lo C, Aoki T, Bonami J, Flegel T, Leu J, Lightner D, Stentiford G, Soderhall K, Walker P, Wang H. (2011). *Nimaviridae Virus Taxonomy, IXth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (pp. 292-234): Elsevier.
- Mansfield KD, Guzy RD, Pan Y, Young RM, Cash TP, Schumacker PT, Simon MC. 2005. Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF- $\alpha$  activation. *Cell metabolism*, 1(6), 393-399.
- Mansfield KD, Simon MC, Keith B. 2004. Hypoxic reduction in cellular glutathione levels requires mitochondrial reactive oxygen species. *Journal of Applied Physiology*, 97(4), 1358-1366.
- Marklund SL, Holme E, Hellner L. 1982. Superoxide-Dismutase in Extracellular Fluids. *Clinica Chimica Acta*, 126(1), 41-51.
- Mathew S, Kumar KA, Anandan R, Nair PGV, Devadasan K. 2007. Changes in tissue defence system in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, 145(3), 315-320.
- 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.
- Miranda-Cruz MM., Poom-Llamas JJ., Godoy-Lugo JA., Morán-Palacio EF., Ortiz R., Rosas-Rodríguez JA., Soñanez-Organis JG. Silencing of HIF-1 in WSSV-infected white shrimp: effect on viral load and antioxidant enzymes *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Mohankumar K, Ramasamy P. 2006. White spot syndrome virus infection decreases the activity of antioxidant enzymes in *Fenneropenaeus indicus*. *Virus Research*, 115(1), 69-75.

- Murshudov GN, Grebenko AI, Brannigan JA, Antson AA, Barynin VV, Dodson GG, Dauter Z, Wilson KS, Melik-Adamyam WR. 2002. The structures of *Micrococcus lysodeikticus* catalase, its ferryl intermediate (compound II) and NADPH complex. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 58(12), 1972-1982.
- Nordberg, Arner. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*, 31(11), 1287-1312.
- Nordberg J, Arner ESJ. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(11), 1287-1312.
- Palazon A, Goldrath AW, Nizet V, Johnson RS. 2014. HIF transcription factors, inflammation, and immunity. *Immunity*, 41(4), 518-528.
- Parrilla-Taylor DP, Zenteno-Savin T, Magallon-Barajas FJ. 2013. Antioxidant enzyme activity in pacific whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to infection with white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 380, 41-46.
- Pascual C, Zenteno E, Cuzon G, Sánchez A, Gaxiola G, Taboada G, Suárez J, Maldonado T, Rosas C. 2004. *Litopenaeus vannamei* juveniles energetic balance and immunological response to dietary protein. *Aquaculture*, 236(1-4), 431-450.
- Reddy SP. 2008. The antioxidant response element and oxidative stress modifiers in airway diseases. *Curr Mol Med*, 8(5), 376-383.
- Romero R. 1994. Estrés oxidativo y degradación de proteínas. *Medicina clínica*, 103(5), 189-196.
- Rosas C, Martinez E, Gaxiola G, Brito R, Sanchez A, Soto LA. 1999. The effect of dissolved oxygen and salinity on oxygen consumption, ammonia excretion and osmotic pressure of *Penaeus setiferus* (Linnaeus) juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 234(1), 41-57.
- Salvemini D, Cuzzocrea S. 2002. Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. *Free Radic Biol Med*, 33(9), 1173-1185.
- Schwarz KB. 1996. Oxidative stress during viral infection: a review. *Free Radic Biol Med*, 21(5), 641-649.
- Semenza. 1998. Hypoxia-inducible factor 1 and the molecular physiology of oxygen homeostasis. *J Lab Clin Med*, 131(3), 207-214.
- Semenza. 2000. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol (1985)*, 88(4), 1474-1480.
- Semenza. 2001. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol*, 13(2), 167-171.

- Sheehan D, MEADE G, FOLEY VM. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*, 360(1), 1-16.
- Soñanez-Organis JG, Peregrino-Uriarte AB, Gomez-Jimenez S, Lopez-Zavala A, Forman HJ, 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 JG, Peregrino-Uriarte AB, Sotelo-Mundo RR, Forman HJ, 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 JG, Racotta IS, Yepiz-Plascencia G. 2010. Silencing of the hypoxia inducible factor 1-HIF-1 obliterates the effects of hypoxia on glucose and lactate concentrations in a tissue-specific manner in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 393(1-2), 51-58.
- Soñanez-Organis JG, Rodriguez-Armenta M, Leal-Rubio B, Peregrino-Uriarte AB, 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.
- Subramanian RP. 2013. Antioxidant defence profile of hepatopancreas, gill and muscle tissue of *Fenneropenaeus indicus* subjected to acute salinity change and WSSV challenge. *International Journal of Research in Zoology*.
- Suzuki K. 2000. Measurement of Mn-SOD and Cu, Zn-SOD. *Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species*. (Oxford University Press, London,), 91-95.
- Tappel AL. 1978. Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Methods in Enzymology*, 52, 506-513.
- Thomas C, Mackey MM, Diaz AA, Cox DP. 2009. Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications for diseases associated with iron accumulation. *Redox Rep*, 14(3), 102-108.
- Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohe R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D, Flohe L. 1995. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol*, 252, 38-53.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84.

- Valyi-Nagy T, Dermody TS. 2005. Role of oxidative damage in the pathogenesis of viral infections of the nervous system. *Histol Histopathol*, 20(3), 957-967.
- van Hulten MC, Witteveldt J, Peters S, Kloosterboer N, Tarchini R, Fiers M, Sandbrink H, Lankhorst RK, Vlak JM. 2001. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology*, 286(1), 7-22.
- Wang W, Zhang X. 2008. Comparison of antiviral efficiency of immune responses in shrimp. *Fish Shellfish Immunol*, 25(5), 522-527.
- Wenger RH, Gassmann M. 1997. Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biological Chemistry*, 378(7), 609-616.
- 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.
- Zinkernagel AS, Johnson RS, Nizet V. 2007. Hypoxia inducible factor (HIF) function in innate immunity and infection. *J Mol Med (Berl)*, 85(12), 1339-1346.