



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**RESPUESTA ANTIOXIDANTE DE GPx2 Y GPx4 ANTE
HIPOXIA Y REOXIGENACIÓN DURANTE EL
SILENCIAMIENTO DE p53 Y GPx4 EN EL CAMARÓN
*Litopenaeus vannamei***

Por:

Paulina Estrada Cárdenas

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de


DOCTORA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Paulina Estrada Cárdenas la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctora en Ciencias




Dra. Gloria Yepiz Plascencia
Directora de Tesis



Dra. Elisa M. Valenzuela Soto
Integrante del comité de tesis



Dra. Carmen A. Contreras Vergara
Integrante del comité de tesis



Dr. Jorge Hernández López
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Respuesta Antioxidante de GPx2 y GPx4 ante Hipoxia y Reoxigenación Durante el Silenciamiento de p53 y GPx4 en el Camarón *Litopenaeus vannamei*" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Paulina Estrada Cárdenas, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Graciela Caire Juvera", is written over a horizontal line.

Dra. Graciela Caire Juvera
Directora General

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el financiamiento otorgado para realizar mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), por abrirme sus puertas y formar parte tan importante en mi formación. Agradezco también a todo el personal de la coordinación de programas académicos (CPA) por el apoyo brindado a través de estos años, por su paciencia, su excelente trato y sobre todo su amabilidad.

A los proyectos A1-S-24557 y PN2017/4869 otorgados por CONAHCYT, que permitieron el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Gloria Yepiz Plascencia por darme la oportunidad de formarme en su grupo de trabajo, por todas las enseñanzas, por la paciencia y el apoyo recibido a lo largo de mi paso por el laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica. Sin duda ha sido un gran ejemplo para mí de constancia, esfuerzo y trabajo duro.

A los miembros de mi comité la Dra. Elisa M. Valenzuela Soto, Dra. Carmen Contreras Vergara y el Dr. Jorge Hernández López, por su apoyo, tiempo y dedicación, así como por el compromiso que cada uno de ustedes tuvo por hacer de éste un mejor trabajo.

A la M.C Alma B. Peregrino Uriarte, de quien aprendí muchísimo a lo largo de estos años. Agradezco su paciencia, amabilidad y disposición. Fue muy afortunado aprender de la mano de alguien con su experiencia y trato.

A la M. C. Lilia Leyva, por el apoyo recibido que facilitó e impulsó el desarrollo de este trabajo. Fue un gusto compartir y trabajar con usted.

A la Dra. Silvia Gómez, el Biol. Luis Adrián Gámez y el M. C. Julio César Apodaca, del Laboratorio de Fisiología de Invertebrados Marinos, por su esfuerzo y apoyo durante el bioensayo. A quienes fueron mis compañeros de laboratorio: M. C. Dalia Cruz, Dra. Laura Camacho, Dra. Laura Hernández, Dr. Ricardo González, Dr. Jorge Duarte, M. C. Marissa Flores, M. C. Omar Granillo, Dra. Dahlia Nuñez y el M. C. Adelmo Rosas, con quienes me tocó compartir buenos momentos y de quienes he aprendido mucho también. Todas grandes personas.

A mis padres Mónica Cárdenas y Juan Carlos Estrada que han sido un importante pilar en mi vida, por todo su apoyo, amor, comprensión y paciencia.

A mi hermana la Dra. Mónica A. Estrada, por su compañía y apoyo, por creer siempre en mí y acompañarme en cada etapa.

A Gabriel H. Gómez, mi mejor amigo y compañero de vida, por toda la paciencia, apoyo y comprensión. Por estar siempre de manera incondicional.

A mis hijos gatunos, Frida, Diego y Peggy, quienes alegran mis días y me brindan compañía.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica dirigido por la Dra. Gloria Yepiz Plascencia en la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A,C. El apoyo financiero para su realización fue proporcionado por el Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) a través del proyecto 4869 “Resilencia del camarón al estrés oxidativo ante condiciones ambientales adversas: hipoxia y temperatura”

DEDICATORIA

A Humberto:

Valoro cada esfuerzo realizado.

No tengo palabras para agradecerte por todo.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	7
CONTENIDO	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE CUADROS	11
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
1. SINOPSIS	14
1.1. Justificación	14
1.2. Antecedentes.....	15
1.2.1. Desarrollo de Hipoxia Durante el Cultivo del Camarón Blanco	15
1.2.2. Estrés Oxidativo Durante la Hipoxia y Reoxigenación	16
1.2.3. Respuesta Antioxidante.....	18
1.2.3.1. Glutación peroxidasas.....	20
1.2.3.2. Glutación Peroxidasas en el Camarón Blanco.....	22
1.2.4. Regulación de la Respuesta Antioxidante por p53.....	23
1.2.5. Relación entre Isoformas de la Glutación Peroxidasa para la Modulación de sus Respuestas.....	25
1.3. Hipótesis	27
1.4. Objetivo General.....	27
1.5. Objetivos Específicos.....	27
1.6. Sección Integradora.....	28
2. p53 KNOCK-DOWN AND HYPOXIA AFFECTS GLUTATHIONE PEROXIDASE 4 ANTIOXIDANT RESPONSE IN HEPATOPANCREAS OF THE WHITE SHRIMP <i>Litopenaeus vannamei</i>	31
3. RESPONSES AND MODULATION OF THE WHITE SHRIMP <i>Litopenaeus vannamei</i> GLUTATHIONE PEROXIDASES 2 AND 4 DURING HYPOXIA, REOXYGENATION AND GPx4 KNOCK-DOWN	43
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	78
4.1. Caracterización de la GPx4 de <i>L. vannamei</i>	78
4.2. Efecto de la Hipoxia y el Silenciamiento de p53 en la Expresión de GPx4 y el Contenido de Proteínas Carboniladas	80
4.3. Efecto del Silenciamiento de la GPx4 en la Expresión de GPx2 Durante la Hipoxia y Reoxigenación	83

CONTENIDO (continuación)

4.4. Cambios en la Actividad Enzimática de GPx Total, GPx4 y el Contenido de Glutación Durante la Hipoxia, Reoxigenación y el Silenciamiento de GPx4.....	86
5. CONCLUSIONES	90
6. RECOMENDACIONES	91
7. REFERENCIAS	92

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Distribución celular de las isoformas de GPx.....	20
2	Funciones pro-oxidantes y antioxidantes de p53 ante diferentes contextos celulares.....	24
3	Cambios en la expresión de GPx4 y el contenido de proteínas carboniladas en respuesta a hipoxia y el silenciamiento de p53.....	81
4	Cambios en la expresión de GPx4 y GPx2, actividad enzimática de GPx total y GPx4 y en la proporción GSH/GSSG por efecto de la hipoxia (H) y la reoxigenación (R) en camarones no silenciados (SS) y silenciados en GPx4 (dsGPx4).....	89

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Glutación peroxidasas de <i>L. vannamei</i> presentes en el genoma del camarón...	23

RESUMEN

Las glutatión peroxidadas (GPx) son importantes enzimas antioxidantes. En vertebrados, existen ocho isoformas de la GPx con diferente distribución, especificidad de sustrato y funciones no canónicas. En la secuencia del genoma del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, se identificaron isoformas de la GPx, pero aún se conoce poco acerca de su modulación durante el estrés y sus mecanismos de regulación. Durante su ciclo de vida, el camarón es afectado por estresores ambientales como la hipoxia y reoxigenación que inducen la acumulación de especies reactivas de oxígeno, por lo que la modulación de la respuesta antioxidante es clave para la resiliencia. En este trabajo, se caracterizó y analizó la expresión en hepatopáncreas de la GPx4 de *L. vannamei* durante la hipoxia y el silenciamiento de p53 para evaluar el rol de p53 como regulador de la respuesta antioxidante de GPx4. También se determinó el contenido de proteínas carboniladas. Además, se evaluó la expresión de GPx2 y GPx4 durante la hipoxia, reoxigenación y el silenciamiento de GPx4, para investigar si la modulación de la respuesta antioxidante de estas isoformas está interrelacionada, y se evaluó la actividad enzimática de GPx total y GPx4, así como los cambios en el contenido de glutatión. En *L. vannamei* existe un único gen que codifica para la GPx4 y que produce dos isoformas. En respuesta a hipoxia, la expresión de GPx4 presentó cambios desde tiempos cortos hasta las 48 h. El silenciamiento de p53 redujo la expresión de GPx4 lo que indica que la expresión de GPx4 es regulada por p53 en el camarón. Interesantemente, no ocurrieron cambios en el contenido de proteínas carboniladas por efecto de la hipoxia, pero si por efecto del silenciamiento de p53. Por otro lado, la GPx2 y GPx4 presentaron patrones de expresión similares en respuesta a hipoxia y reoxigenación en donde su expresión disminuyó durante la hipoxia y se restableció en la reoxigenación a las 6 h en camarones no silenciados. Inesperadamente, el silenciamiento de GPx4 redujo la expresión de GPx2, lo que sugiere que la expresión de GPx4 afecta a la expresión de GPx2. La actividad de GPx total, presentó cambios durante la hipoxia y reoxigenación de 6 h pero a las 12 h se mantuvo sin cambios, mientras que la actividad de GPx4 no fue afectada por los estresores evaluados. El estado redox, no fue afectado a las 6 h pero después de 12 h disminuyó en el hepatopáncreas.

Palabras clave: Hipoxia, reoxigenación, respuesta antioxidante, camarón blanco.

ABSTRACT

Glutathione peroxidases (GPx) are important antioxidant enzymes. There are eight GPx isoforms in vertebrates with different distribution, substrate specificity, and non-canonical functions. In the genome sequence of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*, GPx isoforms were identified, but little is known about their modulation during stress and regulatory mechanisms. The shrimp life cycle is affected by environmental stressors such as hypoxia and reoxygenation that induce the accumulation of reactive oxygen species. Therefore, the modulation of the antioxidant response is key for resilience. In this work, *L. vannamei* GPx4 was characterized and its expression in hepatopancreas was analyzed during hypoxia and p53 silencing to assess the role of p53 as a regulator of the GPx4 antioxidant response. Carbonylated protein content was also determined. In addition, we evaluated the expression of GPx2 and GPx4 during hypoxia, reoxygenation, and GPx4 knock-down, to investigate whether the modulation of the antioxidant response of these isoforms is interrelated; enzymatic activity of total GPx and GPx4 as well as the changes in glutathione content were also determined. In *L. vannamei* there is a unique gene that codes for GPx4 and produces two isoforms. In response to hypoxia, GPx4 expression presented changes from early times up to 48 h. Silencing of p53 reduced GPx4 expression indicating that GPx4 expression is regulated by p53 in shrimp. Interestingly, there were no changes in the content of carbonylated proteins in response to hypoxia, but due to p53 silencing. On the other hand, GPx2 and GPx4 presented similar expression patterns in response to hypoxia and reoxygenation. Their expression decreased during hypoxia and was restored on reoxygenation at 6 h in non-silenced shrimp. Unexpectedly, GPx4 knock-down reduced GPx2 expression, suggesting that GPx4 affects GPx2 expression. Total GPx activity presented changes during hypoxia and reoxygenation at 6 h, but remained unchanged at 12 h, while GPx4 activity was not affected by the stressors evaluated. The redox state was not affected at 6 h but after 12 h, it decreased in the hepatopancreas.

Key words: hypoxia, reoxygenation, antioxidant response, white shrimp.

1. SINOPSIS

1.1. Justificación

El camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, es un peneido de gran relevancia económica debido a que es el principal crustáceo cultivado en todo el mundo (Zhang *et al.*, 2019). Durante su ciclo de vida, el camarón es afectado por diversos estresores, entre ellos la hipoxia y la reoxigenación, que promueven la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, siglas en inglés), las que al reaccionar con biomoléculas como el DNA, lípidos y proteínas, provocan estrés oxidativo, haciendo al organismo susceptible a diversas patologías (Parrilla-Taylor y Zenteno-Savín, 2011; Trasviña-Arenas *et al.*, 2013). La hipoxia, definida como una concentración de oxígeno disuelto (OD) en el agua menor a 2 mg/L, es uno de los principales estresores abióticos que afectan a organismos marinos, entre ellos el camarón (Breitburg *et al.*, 2018). Durante la hipoxia, la producción de ROS aumenta en la mitocondria (Turrens, 2003), alterando el balance redox; además, durante la reoxigenación este incremento es mayor por la disponibilidad del oxígeno como molécula precursora de ROS (Welker *et al.*, 2013).

Una de las principales estrategias para contrarrestar los efectos negativos del estrés oxidativo, es la modulación de las ROS por medio de mecanismos antioxidantes (Welker *et al.*, 2013). El sistema antioxidante se compone de diversas moléculas de bajo peso molecular y enzimas que llevan a cabo la reducción de compuestos. Recientemente, la glutatión peroxidasa 4 (GPx4) ha destacado por su capacidad de reducir hidroperóxidos de lípidos directamente de la membrana celular a diferencia de otras GPxs, por lo que es considerada también citoprotectora (Imai y Nakagawa 2003). En vertebrados, las respuestas de la GPx4 ante diferentes estresores, así como los mecanismos que las regulan, se han estudiado por su relevancia en la respuesta antioxidante (Maiorino *et al.*, 2018). Sin embargo, en invertebrados la información aún es escasa.

En el camarón blanco, algunos estudios han evaluado las respuestas antioxidantes a través de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) durante la hipoxia y reoxigenación (Estrada-Cárdenas *et al.*, 2021; Han *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2016; Parrilla-Taylor y Zenteno-Savín 2011). Li y colaboradores (2016), señalan que en branquias y

hepatopáncreas de *L. vannamei* la actividad enzimática de SOD y GPx incrementa por efecto de la hipoxia. En este mismo organismo, se encontró también que tras 24 h de hipoxia la actividad enzimática de SOD aumenta en músculo y hepatopáncreas pero no la de CAT y GPx (Parrilla-Taylor and Zenteno-Savín 2011). En otro estudio, se encontró que la expresión de GPx no cambia en respuesta a hipoxia y reoxigenación en branquias y hepatopáncreas de *L. vannamei*, mientras que la expresión de CAT y SOD aumenta durante la reoxigenación (Estrada-Cárdenas *et al.*, 2021). Por lo contrario, la actividad enzimática de GPx cambió en el hepatopáncreas durante la reoxigenación pero la actividad de CAT y SOD permaneció sin cambios por efecto de la hipoxia y reoxigenación (Estrada-Cárdenas *et al.*, 2021). Aunque algunos elementos de la respuesta antioxidante se han evaluado en el camarón blanco en respuesta a hipoxia y reoxigenación, aún se conoce poco acerca de las respuestas que enzimas de la segunda línea de defensa antioxidante, como la GPx4, presentan ante estos estresores y la forma en la que son reguladas a nivel molecular. Asimismo, se desconoce si las isoformas de la GPx mantienen alguna interrelación que afecte la modulación de su respuesta antioxidante en el camarón, como ocurre en vertebrados (Ansong, Yang y Diamond 2014; Florian *et al.*, 2010). Por lo anterior, es necesario el estudio de las isoformas de la GPx en *L. vannamei* y sus respuestas ante el estrés, para poder comprender las dinámicas y mecanismos de adaptación que se establecen durante la respuesta antioxidante, ante condiciones de estrés que comúnmente afectan a este organismo.

1.2. Antecedentes

1.2.1. Desarrollo de Hipoxia Durante el Cultivo del Camarón Blanco

L. vannamei es un crustáceo decápodo nativo de la costa oriental del Océano Pacífico. Su cultivo se ha introducido en todo el mundo y se estima que alrededor del 80% de la producción de camarón a nivel mundial corresponde a esta especie, por lo que es considerada una especie de alta relevancia económica (Zhang *et al.*, 2019). El cultivo de esta especie en particular se ha favorecido por sus buenas características de crecimiento en altas densidades de cultivo, además de su adaptabilidad a

amplios intervalos de pH, temperatura y salinidad (González *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2007). Sin embargo, el cultivo del camarón blanco es afectado comúnmente por otros factores abióticos que limitan su crecimiento, reproducción y sobrevivencia.

Actualmente las constantes fluctuaciones de oxígeno que se producen durante el cultivo del camarón constituyen uno de los principales retos para la camaronicultura. Durante el cultivo del camarón, a consecuencia de los cambios diurnos y nocturnos, se presentan fluctuaciones en las concentraciones de oxígeno disuelto en el agua. Durante el día, los niveles de oxígeno suben por la fotosíntesis de las algas en el medio, mientras que durante la noche, descienden por el consumo de los organismos en ausencia de la fotosíntesis de las algas (Welker *et al.*, 2013). Además, el desarrollo de zonas hipóxicas se ha incrementado en los últimos años en zonas costeras, por el aumento de la temperatura en los océanos derivado del calentamiento global, así como por el incremento de las actividades antropogénicas (Breitburg *et al.*, 2018).

La hipoxia, es uno de los principales factores que limitan la supervivencia, crecimiento y reproducción de los organismos marinos (Pörtner y Knust 2007). En el camarón blanco, la hipoxia puede alterar los ciclos de muda (Charmantier *et al.*, 1994), limitar la sobrevivencia (Duan *et al.*, 2014), alterar el metabolismo aerobio (Racotta *et al.*, 2002) e incrementar la apoptosis en hemocitos (Felix-Portillo *et al.*, 2016). Adicionalmente, durante el periodo de restablecimiento del oxígeno subsecuente a los periodos de hipoxia, conocido como reoxigenación, se puede producir una mayor cantidad de efectos negativos en el organismo por el aumento en la producción de ROS (Welker *et al.*, 2013).

1.2.2. Estrés Oxidativo Durante la Hipoxia y Reoxigenación

La producción de ROS en los organismos, es un proceso constante durante el metabolismo aerobio; se ha estimado que entre el 0.1 – 0.2 % del oxígeno consumido por la célula, es convertido en ROS (Fridovich 2004). En sistemas biológicos, las principales ROS que se producen son el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^\cdot) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Schieber y Chandel, 2014). En condiciones normales, la producción y eliminación o reducción de ROS en la célula mantiene un balance, sin embargo, en condiciones de estrés la producción de ROS aumenta

ocasionando el desbalance del estado redox conocido como estrés oxidativo, que afecta al ADN, lípidos y proteínas al promover la modificación oxidativa de estas moléculas (Abele y Puntarulo, 2004).

En el caso del ADN, la interacción del material genético nuclear y mitocondrial con las ROS puede causar modificaciones en bases, como la 8-hidroxi-guanosina, la escisión de nucleótidos y la formación de aductos (Bandyopadhyay *et al.*, 1999; Valko *et al.*, 2007). En cuanto a las proteínas, su reacción con las ROS promueve la oxidación de aminoácidos, la formación de aductos proteína-proteína y la degradación temprana (Berlett y Stadtman, 1997). Además, durante el estrés oxidativo, se pueden producir modificaciones postraduccionales como la carbonilación de proteínas o la S-glutacionilación, lo que modifica la actividad catalítica de las enzimas, la estructura de las proteínas y activa procesos de señalización oxidativa (Dalle-Donne *et al.*, 2009). Por su parte, los lípidos son altamente susceptibles a la oxidación y el rompimiento durante el estrés oxidativo, lo que puede desencadenar procesos degenerativos. Los hidroperóxidos de lípidos (LOOHs) son intermediarios no radicales de la oxidación de lípidos, que reaccionan con otros componentes lipídicos de la membrana celular causando su desestabilización y rompimiento. Además, son precursores de genotoxinas como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-2-nonenal (Blair 2001; Girotti 1998).

Contrario a lo que se podría esperar, durante la hipoxia, aumenta la producción de ROS por el complejo III de la mitocondria (Chandel *et al.*, 1998; Turrens, 2003) y ésta es aún mayor durante la reoxigenación por la disponibilidad del oxígeno como molécula precursora (Welker *et al.*, 2013). La producción de ROS durante la hipoxia y reoxigenación juega un papel importante en la respuesta adaptativa de los organismos, debido a que no solo están implicadas en procesos patológicos, sino también en procesos de señalización celular y regulación (Valko *et al.*, 2007). Durante la hipoxia, se activan factores de transcripción que regulan la expresión de genes involucrados en la respuesta adaptativa (Li y Jackson, 2002). La regulación de genes durante la hipoxia constituye una estrategia importante para la sobrevivencia y adaptación de los organismos a su medio ambiente. Sin embargo, en invertebrados marinos aún no han sido completamente elucidados los mecanismos que permiten la adaptación y supervivencia. En el camarón blanco, el estrés oxidativo se ha asociado a múltiples condiciones como la exposición a xenobióticos (Qian *et al.*, 2014), cambios en el pH, salinidad (Pan *et al.*, 2007) y temperatura (González *et al.*, 2010), así como la exposición a condiciones de hipoxia y reoxigenación (Parrilla-Taylor y Zenteno-Savín,

2011). En este organismo, como en otros, los mecanismos antioxidantes desempeñan un papel importante para contener los efectos negativos del estrés oxidativo durante la hipoxia.

1.2.3. Respuesta Antioxidante

Debido a que los organismos se encuentran expuestos de manera constante al estrés oxidativo, el papel del sistema antioxidante resulta de gran relevancia para el mantenimiento de la homeostasis redox y la disminución del daño oxidativo. Los mecanismos de defensa de este sistema, incluyen la prevención de la formación de nuevos radicales y ROS, la reducción de estos mediante la interacción con otros compuestos o proteínas y la reparación del daño oxidativo (Ighodaro y Akinloye 2018).

El sistema antioxidante se integra por distintos compuestos de bajo peso molecular y enzimas que actúan en conjunto para llevar a cabo sus funciones. Entre los componentes enzimáticos del sistema antioxidante se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx), que son consideradas la primera línea de defensa antioxidante ya que actúan directamente sobre el O_2^- y el H_2O_2 , mientras que en la segunda línea de defensa antioxidante se encuentran aquellas enzimas que evitan la formación del radical OH^\cdot y otras ROS que pueden formarse por la interacción de componentes celulares con el OH^\cdot como los hidroperóxidos de fosfolípidos (LOOHs) (Pradedova *et al.*, 2011). La GPx4, es una de las principales enzimas en la segunda línea de defensa antioxidante, que además tiene funciones citoprotectoras por su capacidad de reducir directamente LOOHs en membranas celulares (Girotti 1998).

Ante condiciones de estrés, la regulación de las respuestas antioxidantes ocurre por diferentes mecanismos. En la teoría de preparación para el estrés oxidativo (POS, siglas en inglés), propuesta por Hermes-Lima *et al.*, (1998) y que tras 20 años ha ido cobrando fuerza con la contribución de diversos estudios que sustentan la idea, se propone que durante el estrés oxidativo ocurre la activación temprana de la respuesta antioxidante, como parte de un proceso de preparación y adaptación de los organismos ante condiciones desfavorables (Giraud-Billoud *et al.*, 2019). Sin embargo, durante la hipoxia, la concentración de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos suele

variar, dependiendo del tiempo que se prolongue esta condición, mientras que los componentes no enzimáticos resultan particularmente importantes durante la reoxigenación (Li y Jackson, 2002). En el camarón blanco, la expresión de la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) y la GPx, aumenta a las 4 h en el hepatopáncreas durante la hipoxia, pero tras 24 h de exposición a hipoxia la expresión de la GPx disminuye significativamente a diferencia de la expresión de la MnSOD (Kniffin *et al.*, 2014). En contraste, García-Triana y colaboradores (2010) señalan que en branquias y hepatopáncreas de *L. vannamei* la expresión de la MnSOD disminuye después de 6 h de hipoxia y retorna a sus niveles normales durante la reoxigenación. Trasviña-Arenas y colaboradores (2013) encontraron que en este mismo organismo la expresión de la CAT no presenta cambios por efecto de la hipoxia en hepatopáncreas, pero si en branquias. Por lo contrario, en el estudio realizado por Estrada-Cárdenas y colaboradores (2021) se encontró que a las 24 h la expresión de CAT no aumenta en branquias por efecto de la hipoxia pero si por efecto de la reoxigenación, a diferencia de la expresión de MnSOD que aumenta durante la hipoxia.

Pese a que algunos estudios han investigado los cambios en la respuesta antioxidante del camarón durante la hipoxia y la reoxigenación, en la mayoría de ellos, han sido evaluados como indicadores de la respuesta antioxidante los cambios en la actividad y expresión de enzimas como la SOD, la CAT y la GPx que componen la primera línea de defensa antioxidante. No obstante, el estudio de los componentes antioxidantes que intervienen en otros niveles de la defensa antioxidante aportaría información relevante que contribuya a describir un panorama más extenso de la respuesta antioxidante ante la hipoxia y reoxigenación en crustáceos. En vertebrados, han sido identificadas al menos ocho isoformas de la GPx con distinta distribución celular y tisular, que intervienen en diferentes puntos de la regulación de la respuesta antioxidante (Brigelius-Flohé y Maiorino, 2013). De manera similar, en el camarón blanco se han identificado algunas isoformas de la GPx, como la GPx2 (Liu *et al.*, 2007) y la GPx3 (Fan *et al.*, 2022), y es probable que puedan existir algunas otras que contribuyan en diferentes puntos de regulación de la respuesta antioxidante, similar a lo que ocurre en vertebrados.

1.2.3.1. Glutación peroxidasas. Las glutación peroxidasas son enzimas con funciones antioxidantes y con una amplia distribución en todos los organismos vivos. En mamíferos, se han descrito al menos ocho isoformas de la GPx, de las cuales cinco son selenoproteínas (Mariotti *et al.*, 2012). La existencia de varias isoformas de esta enzima en vertebrados podría sugerir una aparente redundancia biológica, que se ha justificado por su acción a diferentes niveles de la defensa antioxidante (Pradedova *et al.*, 2011), distinta localización celular y tisular (Margis *et al.*, 2008), diferencias en la especificidad por sustratos (Brigelius-Flohé y Kipp 2012), así como algunas funciones no canónicas (Nomura *et al.*, 2001; Puglisi *et al.*, 2005) (Figura 1).

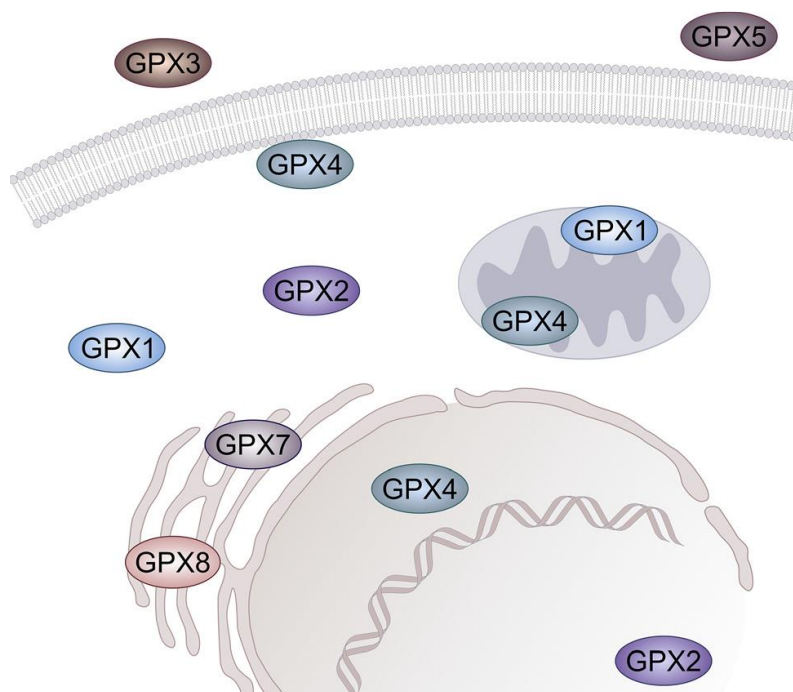


Figura 1. Distribución celular de las isoformas de GPx (Buday y Conrad 2020).

En vertebrados, la GPx1 es una enzima ampliamente distribuida en todos los tejidos que se ubica en el citosol y la mitocondria de las células, mientras que la GPx2 inicialmente fue descrita como específica del tracto digestivo y por lo tanto, se le nombró también como glutación peroxidasas gastrointestinal (GI-GPx, siglas en inglés); sin embargo, en mamíferos se ha encontrado su expresión en otros tejidos (Brigelius-Flohé y Kipp 2012). La GPx3 por su parte, es una proteína secretada que se encuentra en plasma, mientras que la GPx4 está presente en la mitocondria, el

citosol y el núcleo, donde su principal función es la protección del daño oxidativo en membranas. En cuanto a la GPx5, similar a la GPx3, es una proteína secretada y se encuentra únicamente en el epidídimo, mientras que la GPx6 es específica del epitelio olfativo. La GPx7 y GPx8 por su parte, han sido poco estudiadas hasta el momento por lo que la información acerca de éstas es escasa (Brigelius-Flohé y Maiorino 2013; Maiorino *et al.*, 2003).

Las GPxs llevan a cabo la reducción del H₂O₂ o hidroperóxidos orgánicos a agua y su correspondiente alcohol usando al glutatión (GSH), como electro donador. La interacción de la enzima con su sustrato requiere de la presencia de los residuos de Selenocisteína (Sec) o cisteína (Cys), glutamina (Gln) y triptófano (Trp) (Labunsky *et al.*, 2014). En algunas isoformas de la GPx no selenodependientes, el residuo de Sec es sustituido por uno de Cys, sin embargo, éstas tienen una baja actividad enzimática en comparación con aquellas que contienen a la Sec como residuo catalítico redox activo (Toppo *et al.*, 2008). La Sec en las GPxs selenodependientes es incorporada al sitio catalítico en lugar de la Cys por la presencia del codón ópalo (UGA), que usualmente causa la terminación de la traducción (Margis *et al.*, 2008). Un requerimiento importante para la inserción de la Sec, es la presencia de un bucle en la región 3-UTR del mRNA conocido como secuencia de inserción de selenocisteína (SECIS, siglas en inglés), que se encarga de reclutar al tRNA específico, así como a las proteínas de unión necesarias para la formación del complejo encargado de la inserción de este aminoácido modificado (Burk *et al.*, 2003).

Otro aspecto relevante durante la inserción de Sec en las selenoproteínas, es la biodisponibilidad de selenio (Se), ya que la disponibilidad y metabolismo del Se en los organismos regula la síntesis de selenoproteínas y sus patrones de expresión en diferentes tejidos. En mamíferos, existe una jerarquía en la distribución del Se en la que se priorizan aquellos tejidos que mantienen funciones vitales como el cerebro. Además, cuando la disponibilidad de Se es limitada, los transcritos de las distintas selenoproteínas compiten para mantener su capacidad de biosíntesis y aunque los mecanismos que rigen esta jerarquía en la biosíntesis de selenoproteínas no son bien comprendidos, se ha sugerido que refleja la relevancia biológica de algunas selenoproteínas (Brigelius-Flohé 2006; Schomburg y Schweizer 2009). Hasta el momento, la jerarquía establecida entre selenoproteínas indica que pese a que la GPx1 se encuentra ampliamente distribuida en diferentes tejidos y mantiene una alta actividad catalítica, al igual que la GPx3, se encuentran en un bajo orden jerárquico, mientras que la GPx2 y GPx4 se encuentran en un orden de prioridad elevado

(Schomburg y Schweizer, 2009), lo que podría sugerir que estas enzimas poseen una mayor relevancia biológica.

1.2.3.2 Glutación Peroxidasas en el Camarón Blanco. Las GPxs son la familia más grande y estudiada de selenoproteínas. En algunos organismos como el humano, el selenoproteoma es codificado hasta por 25 genes, mientras que en organismos como el ratón tiene 24 genes (Mariotti *et al.*, 2012). En algunos organismos, los eventos evolutivos han modificado el uso de la Sec en algunas proteínas en las que este aminoácido ha sido remplazado por una Cys (Lobanov *et al.*, 2007). Esta serie de cambios evolutivos ha ocasionado la pérdida de selenoproteínas en diferentes organismos generando que entre especies existan diferencias importantes en la composición del selenoproteoma.

En algunos insectos como la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, el mosquito *Anopheles gambiae* y en la abeja *Apis mellifera*, el selenoproteoma consta únicamente de una a tres selenoproteínas, y de manera similar, en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* el selenoproteoma contiene solo un único gen (Kryukov y Gladyshev, 2000), mientras que en algunos hongos, el selenoproteoma se ha perdido completamente (Lobanov *et al.*, 2007). En contraste, en organismos acuáticos se han identificado selenoproteomas grandes, y se sugiere que la mayor disponibilidad del Se en el medio acuático ha permitido a estos organismos conservar evolutivamente un selenoproteoma más abundante; un claro ejemplo es el pez cebra que posee un amplio selenoproteoma (Labunskyy *et al.*, 2014).

En *L. vannamei*, el selenoproteoma aún no ha sido estudiado en profundidad por lo que se desconoce con exactitud cuántas proteínas lo integran y cuáles son los genes que las codifican, sin embargo, se sabe que el camarón blanco cuenta al menos con una selenoproteína M (Clavero-Salas *et al.*, 2007), una GPx selenodependiente (Liu *et al.*, 2007) y una GPx3 (Fan *et al.*, 2022). A partir de la publicación de la secuencia del genoma del camarón blanco por Zhang y colaboradores (2019), fue posible identificar una gran cantidad de genes relacionados a múltiples procesos biológicos, entre ellos varios implicados en la respuesta antioxidante y particularmente algunos que corresponden a diferentes isoformas de la GPx (Cuadro 1). Sin embargo, se desconoce cómo estas isoformas de la GPx son reguladas en el camarón en respuesta a estresores, así como los aspectos moleculares que se involucran en su respuesta antioxidante.

En vertebrados, la respuesta antioxidante es regulada por diferentes factores de transcripción, entre ellos p53 que interviene en la respuesta antioxidante por medio de la regulación de genes prooxidantes y antioxidantes en respuesta al estrés (Budanov 2014). Por lo que es probable que mecanismos similares estén involucrados en la regulación de la respuesta antioxidante en el camarón blanco. Además, es probable que exista también una regulación por parte de las isoformas de GPx que intervenga en la modulación de sus respuestas antioxidantes.

Cuadro 1. Glutación peroxidasas de *L. vannamei* presentes en el genoma del camarón

Gen ID	Proteína	Longitud (amino ácidos)	Nombre de la proteína
113800343	XP_027206898.1	188	glutathione peroxidase-like isoform X1
113800343	XP_027206907.1	162	PHGPx-like isoform X2
113800343	XP_027206916.1	162	PHGPx-like isoform X2
113800343	XP_027206924.1	162	PHGPx-like isoform X2
113800343	XP_027206933.1	162	PHGPx-like isoform X2
113805292	XP_027212087.1	206	glutathione peroxidase 7-like
113809863	XP_027217345.1	115	epididymal secretory GPx-like, partial
113816684	XP_027224546.1	137	glutathione peroxidase-like
113816686	XP_027224548.1	107	glutathione peroxidase-like
113819894	XP_027227928.1	139	glutathione peroxidase 2-like
113819893	XP_027227927.1	202	glutathione peroxidase 2-like
113826359	XP_027235031.1	212	glutathione peroxidase-like

1.2.4. Regulación de la Respuesta Antioxidante por p53

La proteína p53 es un factor de transcripción que se activa en respuesta a distintos estímulos celulares y se une a secuencias consenso en el DNA para regular la expresión de diferentes genes (Nuñez-Hernandez *et al.*, 2018). Por sus funciones, p53 es conocido como “el guardián del genoma” ya que regula la respuesta celular ante el daño al DNA y transactiva la expresión de genes

relacionados con la generación y eliminación de ROS, lo que contribuye en el proceso de muerte celular mediado por p53 (Li *et al.*, 2017; Polyak *et al.*, 1997). Durante el estrés oxidativo severo, p53 induce la expresión de genes prooxidantes como PIG-3 y PIG-6 (Polyak *et al.*, 1997) que promueven la formación de ROS y consecuentemente la muerte celular por apoptosis, sin embargo, durante el estrés leve o moderado p53 induce la expresión de genes involucrados en la respuesta antioxidante (Bensaad y Vousden, 2007), lo que contribuye a disminuir las alteraciones en el DNA y el daño celular durante los procesos fisiológicos normales y de adaptación a condiciones estresantes (Sablina *et al.*, 2005) (Figura 2).

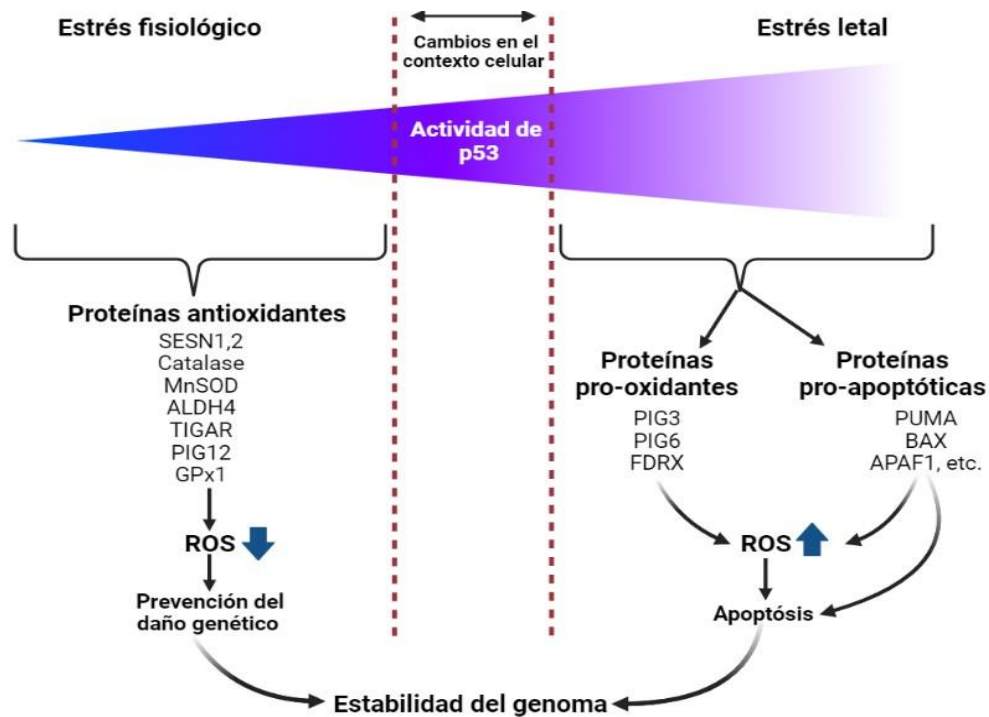


Figura 2. Funciones pro-oxidantes y antioxidantes de p53 ante diferentes contextos celulares. Imagen modificada de: Olovnikov *et al.*, (2009).

En la tilapia *Oreochromis niloticus*, la expresión de la MnSOD y la GPx es regulada por la unión de p53 a la región promotora de los genes que codifican para estas enzimas antioxidantes (Mai *et al.*, 2010). De manera similar, en el humano existen secuencias consenso para la unión de p53 en la región promotora de los genes de la MnSOD y GPx (El-Deiry *et al.*, 1992; Tan *et al.*, 1999), mientras que en este mismo organismo, la expresión de la GPx2 es regulada por p63, una proteína

de la familia de p53, que promueve la expresión de la GPx2 y reduce el estrés oxidativo y la apoptosis en células MCF-7 (Yan y Chen, 2006). Hussain y colaboradores (2004) encontraron que la expresión de la MnSOD y GPx aumenta significativamente en cultivos de línea celular fibroblástica humana TR9-7 tras inducir la expresión de p53, en contraste, la expresión de CAT no presentó cambios.

Las funciones de p53 como factor de transcripción han sido ampliamente estudiadas en la regulación del ciclo celular, la senescencia, la apoptosis y el metabolismo celular en vertebrados, sin embargo, sus funciones como regulador de la respuesta antioxidante, aún no han sido completamente elucidadas. En invertebrados marinos, la relación de p53 y la respuesta antioxidante ha sido evaluada en solo unos cuantos organismos. En el camarón *Penaeus monodon*, el silenciamiento de p53 disminuye la expresión de la GPx4 en branquias y hepatopáncreas; además, ante condiciones de estrés por cambios en el pH (9.0), la salinidad (2.3 y 4.3 %) y la exposición a metales (Cu, Zn y Cd), los genes de p53 y la GPx4 presentan tendencias similares de expresión, lo que sugiere una posible regulación de la expresión génica de la GPx4 por p53 (Li *et al.*, 2017).

De manera similar, en *L. vannamei* el silenciamiento de p53 redujo la expresión de la MnSOD y la GPx, además, en respuesta a cambios en el pH (6.1, 8.1 y 10.1) y la exposición a Cd, la expresión de p53, GPx y la MnSOD presentaron patrones similares, lo que indica una posible relación entre estos tres genes (Qian *et al.*, 2014). A pesar de que hay información que sugiere que de forma similar a lo que ocurre en vertebrados, p53 podría regular la respuesta antioxidante en crustáceos, este aspecto no ha sido explorado en profundidad, por lo que aún se desconocen diversos aspectos del papel de p53 en la respuesta antioxidante de crustáceos.

1.2.5. Relación entre Isoformas de la Glutación Peroxidasa para la Modulación de sus Respuestas

Otro aspecto que resulta interesante en la regulación de las GPxs es que, al existir varias isoformas podrían presentarse interrelaciones para la modulación de su respuesta antioxidante. En mamíferos existen hasta ocho miembros en la familia de las GPxs que se diferencian por su secuencia primaria (aminoácidos), especificidad de sustrato y su respectiva localización subcelular y tisular (Tian *et*

al., 2021). Estas diferencias permiten que las isoformas de la GPx actúen a diferentes niveles de la defensa antioxidante (Girotti, 1998; Pradedova *et al.*, 2011), modifiquen la señalización celular mediada por ROS de diferentes formas y se involucren en otros procesos celulares (Kipp, 2017), por lo que es importante que sus funciones se encuentren reguladas. Sin embargo, aún no está bien elucidado si las isoformas de la GPx interactúan entre sí, ya sea de manera directa o indirecta, como parte de sus mecanismos de regulación y como afecta esto a su respuesta antioxidante

En un estudio realizado en células de adenocarcinoma colorrectal (Caco-2) se encontró que el silenciamiento de GPx1 con iRNA, no afecta la expresión de otras selenoproteínas como la Sel W, Sel H, GPx2 y GPx4, asimismo, el nivel de ROS no incrementó por efecto del silenciamiento de GPx1 (Gong *et al.*, 2012). Por lo contrario, Esworthy y colaboradores (2000), señalan que durante la inactivación del gen de la GPx1 en ratones, los niveles de mRNA de GPx2 son afectados en el yeyuno e íleon, llegando a reducirse hasta en un 50 % con respecto a los ratones control. En contraste, la eliminación del gen de GPx2 en ratones, incrementó la expresión de GPx1 en colon e íleon, principalmente en la base de criptas donde típicamente se localiza la GPx2, sin embargo, no hubo un incremento en los niveles de transcrito de GPx1, por lo que es probable que el incremento ocurra por mecanismos post-transcripcionales. También se detectó un incremento en la actividad de GPx en íleon y colon por efecto de la eliminación del gen de GPx2, mientras que la actividad de GPx4 no fue afectada (Florian *et al.*, 2010).

De manera similar, otras selenoproteínas pueden establecer interacciones con isoformas de la GPx afectando sus dinámicas. El incremento en la expresión de la proteína de unión a selenio 1 (SBP1, siglas en inglés) en células cancerígenas de colon HCT116 y células de cáncer de mama MCF-7 redujo la actividad de GPx1 ~50%, mientras que la concentración de proteína y los niveles de transcritos permanecieron sin cambios indicando que la reducción en la actividad ocurre por mecanismos post-traduccionales. En contraste, la sobreexpresión de GPx1 en células MCF-7 disminuyó la cantidad de mRNA y proteína de SBP-1, asimismo, un constructo con un gen reportero y con la secuencia promotora de SBP-1 de humanos, mostró que la sobreexpresión de GPx1 inhibe la transcripción a partir del promotor de SBP-1 (Fang *et al.*, 2010).

Por su parte, la eliminación del gen de la Sel P en ratones, redujo la expresión de Sel W y GPx4 en cerebro y testículos, mientras que en pulmón y corazón ocurrió lo contrario e incrementó la expresión de Sel W y GPx4 (Hoffmann *et al.*, 2007). Los cambios en los patrones de expresión y actividad enzimática de isoformas de la GPx ante el silenciamiento o eliminación de otras

selenoproteínas sugieren una relación entre algunas de estas. Sin embargo, varios aspectos respecto a las relaciones directas o indirectas que pueden establecerse y los mecanismos por los que ocurren sigue sin estar claros. Por lo anterior, en este trabajo se plantearon la hipótesis y objetivos siguientes.

1.3. Hipótesis

La expresión de la GPx4 es modulada por p53 durante la hipoxia y a su vez, el silenciamiento de GPx4 induce cambios en la respuesta antioxidante de GPx2 en camarones sometidos a hipoxia y reoxigenación.

1.4. Objetivo General

Caracterizar el gen de la GPx4 y evaluar la expresión de GPx4 durante la hipoxia y el silenciamiento de p53, así como los cambios en la expresión de GPx2 durante el silenciamiento de GPx4 en camarones sometidos a hipoxia y reoxigenación.

1.5. Objetivos Específicos

1. Caracterizar el gen de la GPx4 e identificar los sitios de regulación por análisis *in silico* y modelar su proteína.
2. Analizar el efecto del silenciamiento de p53 en los cambios de expresión de GPx4.
3. Evaluar el contenido de proteínas carboniladas como indicador de daño oxidativo en camarones silenciados en p53 durante la hipoxia.
4. Analizar el efecto del silenciamiento de GPx4 en la expresión de GPx2.

5. Evaluar la actividad enzimática de GPx total, GPx4 y el contenido de glutatión en respuesta a hipoxia y reoxigenación en camarones silenciados en GPx4.

1.6. Sección Integradora

Esta tesis está compuesta por dos artículos. En el primer artículo titulado “p53 knock-down and hypoxia affects glutathione peroxidase 4 antioxidant response in hepatopancreas of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*”, publicado en el 2022 en la revista Biochimie, se caracterizó y analizó el gen de la GPx4 de *L. vannamei*, además, se evaluó la expresión de este gen en respuesta a hipoxia y el silenciamiento de p53 en hepatopáncreas del camarón. También, se determinó el contenido de proteínas carboniladas como indicador del daño oxidativo. La finalidad de estos análisis fue conocer el efecto de la hipoxia en la expresión de GPx4, así como el rol de p53 como posible regulador de la respuesta antioxidante.

El análisis de la secuencia del genoma del camarón indicó que en *L. vannamei* hay un único gen que codifica para la GPx4 y que produce cinco variantes del transcrito, éstas fueron verificadas experimentalmente por secuenciación y sus secuencias fueron publicadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) con los códigos de acceso: GPx4TV1Lv, OL630777; GPx4TV2Lv, OL630778; GPx4TV3Lv, OL630779; GPx4TV4Lv, OL630780 y GPx4TV5Lv, OL630781. El análisis *in silico* indicó que dos isoformas con diferente localización celular son producidas a partir del gen de la GPx4. Además, se identificaron por análisis bioinformático, secuencias consenso para la unión de HIF-1, p53 y p63 en la región promotora del gen. Como parte de los análisis *in silico*, también se realizó el modelado por homología de la GPx4 de *L. vannamei* y se evaluó su relación filogenética con otras secuencias de aminoácidos de GPxs de otros crustáceos. El modelado por homología predijo una estructura monomérica con un plegamiento que es característico de tioredoxinas. Por su parte, el árbol filogenético indicó que la GPx4 de *L. vannamei* se encuentra evolutivamente más cercana a la GPx7 y GPx4 de otros crustáceos que a la GPx1, 2, 3, 5 y 6.

Para evaluar el efecto de la hipoxia y el silenciamiento de p53 en la expresión de GPx4, se emplearon muestras de camarones provenientes de un bioensayo realizado en el 2019 por la Dra.

Laura Camacho Jiménez, quien sometió a los organismos a las siguientes condiciones: normoxia (5.04 ± 0.17 mg O₂/L), normoxia y el silenciamiento de p53 con dsRNA (dsp53), hipoxia (1.05 ± 0.09 mg O₂/L) e hipoxia con dsp53. Los tratamientos tuvieron una duración de 1, 6, 24 y 48 h. A partir de las muestras recolectadas de este bioensayo se determinó la expresión de GPx4 en músculo, branquias y hepatopáncreas. La expresión de GPx4 fue mayor en el hepatopáncreas, seguida de branquias, mientras que en músculo resultó indetectable. Tomando en consideración lo anterior, los análisis para evaluar los cambios en la expresión de GPx4 en respuesta a hipoxia y el silenciamiento de p53, así como el contenido de proteínas carboniladas, fueron realizados empleando hepatopáncreas. Al evaluar la expresión de GPx4, se encontró que tanto la hipoxia como el silenciamiento de p53 tienen un efecto importante en los cambios en la expresión de GPx4. Durante el silenciamiento de p53 la expresión de GPx4 disminuyó significativamente desde la primera hora, indicando que la expresión de GPx4 es regulada por este factor de transcripción, lo que es consistente con los resultados obtenidos en el análisis *in silico* de la región promotora del gen. Por otro lado, la expresión de GPx4 también presentó cambios en respuesta a hipoxia, incrementando durante la primera hora, pero disminuyendo a las 6 y 48 h.

En el segundo artículo, titulado “Responses and modulation of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* glutathione peroxidases 2 and 4 during hypoxia, reoxygenation and GPx4 knock-down”, que fue enviado a la revista Biochimie el 07 de febrero del 2023 y se encuentra en revisión, se evaluaron los cambios en la expresión de GPx2 y GPx4 en respuesta a la hipoxia, reoxigenación y el silenciamiento de GPx4 en el hepatopáncreas del camarón. También se analizaron los cambios en la actividad enzimática de GPx total y GPx4, así como en el contenido de glutatión a las 0, 6 y 12 h. El silenciamiento de la GPx4 disminuyó la expresión de GPx2, sugiriendo una relación entre estas dos selenoproteínas. Además, la GPx2 y GPx4, presentaron patrones de expresión similares en respuesta a hipoxia y reoxigenación; en ambos casos ocurrió una reducción en la expresión por efecto de la hipoxia y un restablecimiento durante la reoxigenación a las 6 h, mientras que las 12 h no se encontraron cambios. Por otro lado, la actividad enzimática de GPx4 no presentó cambios por efecto de ninguno de los estresores evaluados, mientras que la actividad de GPx total incrementó por efecto de la reoxigenación a las 6 h.

Finalmente, el contenido de glutatión no cambió por efecto de la hipoxia, reoxigenación o el silenciamiento de GPx4, sin embargo, la relación GSH/ GSSG (glutatión reducido/glutatión oxidado), empleada como indicador del estado redox, presentó una importante disminución a las

12 h durante la hipoxia y reoxigenación, indicando que en este tiempo el estado redox del hepatopáncreas es afectado por estos estresores. En conjunto estos resultados indican que la hipoxia y reoxigenación son importantes estresores que afectan el estado redox del camarón y producen cambios en la expresión de enzimas antioxidantes como la GPx2 y GPx4, así como cambios en la actividad enzimática de GPx total. Los hallazgos reportados en este estudio sugieren también una relación entre la GPx2 y GPx4, ya que la expresión de GPx2 disminuyó por efecto del silenciamiento de GPx4 en hepatopáncreas, además, la expresión de GPx2 y GPx4 presentó una respuesta paralela durante la hipoxia y reoxigenación.

**2. p53 KNOCK-DOWN AND HYPOXIA AFFECTS GLUTATHIONE PEROXIDASE 4
ANTIOXIDANT RESPONSE IN HEPATOPANCREAS OF THE WHITE SHRIMP**

Litopenaeus vannamei

Paulina Estrada-Cárdenas, Laura Camacho-Jiménez, Alma B. Peregrino-Uriarte, Carmen A.
Contreras-Vergara, Jorge Hernández-López, Gloria Yepiz-Plascencia

Publicado el 25 de marzo del 2022

Biochimie 199 (2022) 1-11

DOI: 10.1016/j.biochi.2022.03.010



p53 knock-down and hypoxia affects glutathione peroxidase 4 antioxidant response in hepatopancreas of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*

Paulina Estrada-Cárdenas^a, Laura Camacho-Jiménez^a, Alma B. Peregrino-Uriarte^a, Carmen A. Contreras-Vergara^a, Jorge Hernandez-López^b, Gloria Yepiz-Plascencia^{a,*}

^a Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), A.C., Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas, No. 46, Col. La Victoria, Hermosillo, Sonora, 83304, Mexico

^b Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), S.C., Campus Hermosillo, Calle Hermosa No. 101, Col. Los Ángeles, Hermosillo, Sonora, 83106, Mexico



ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 November 2021

Received in revised form

1 March 2022

Accepted 25 March 2022

Keywords:

Hypoxia

Shrimp

Oxidative stress

Antioxidant and cytoprotective

ABSTRACT

Hypoxia (<2 mg O₂/L) is one of the main environmental stressors that affects aquatic organisms, including the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). During hypoxia, reactive oxygen species (ROS) accumulation induces oxidative stress and damage to biomolecules. Redox state and ROS overproduction are modulated by the antioxidant system that is composed of several antioxidant enzymes, proteins, and other small compounds. Glutathione peroxidase 4 (GPx4) has emerged as an important antioxidant enzyme with cytoprotective roles. In vertebrates, antioxidant and pro-oxidant stress responses are regulated by several factors, including the p53 protein. However, little is known about GPx4 responses in crustaceans and the regulation by p53. Herein we analyzed and characterized the *L. vannamei* GPx4 and evaluated the responses to hypoxia and p53 knock-down. We found a unique GPx4 gene that produces five transcript variants (TVs) and only two protein isoforms with distinct cellular localization. GPx4 expression in hepatopancreas during hypoxia and p53 knock-down changed during short and long-term hypoxia, suggesting that GPx4 may be a sensitive indicator of antioxidant imbalance during stress. Knock-down of p53 induced a reduction in GPx4 expression, indicating that p53 modulates GPx4 responses during stress. This agrees with our findings of putative consensus sequences for p53 in the GPx4 gene promoter by *in silico* analysis. Also, the antioxidant response was effective in preventing major protein damage during hypoxia since no changes were detected in carbonylated proteins content in hepatopancreas during hypoxia. Conversely, p53 knock-down produced significant changes in carbonylated proteins.

© 2022 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

1. Introduction

Hypoxia is occurring more frequently in aquatic zones during recent years, affecting the aquaculture of many organisms [1], including the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*), that is the most cultivated penaeid species worldwide [2]. However, this shrimp appears to survive quite well to harsh hypoxic conditions [3]. During hypoxia, higher cellular ROS production can damage proteins, lipids, and DNA. In *L. vannamei* as in other organisms, the

redox state and ROS levels are modulated by the antioxidant system that counteract oxidative stress.

Some antioxidant responses of *L. vannamei* to hypoxia have been evaluated in several studies [4–7]; but most of the reports focus on the first antioxidant defense line that includes the enzymes superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6) and glutathione peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9). The main functions of these enzymes are to prevent oxidative damage. However, once ROS production overpasses the antioxidant capacity, a second antioxidant defense line with regenerative and cytoprotective roles prevents the degenerative phase during oxidative stress [8,9].

Glutathione peroxidase 4 (GPx4, EC 1.11.1.12) is a member of the

* Corresponding author.

E-mail address: gyepiz@ciad.mx (G. Yepiz-Plascencia).

widespread family of glutathione peroxidases of the second antioxidant defense line, since unlike other GPxs, its main function is to reduce lipid hydroperoxides in membranes, thus, it is considered a cytoprotective protein [8]. Few studies in marine invertebrates have explored GPx4 as a stress responsive biomarker. In *Panaeus monodon*, GPx4 gene expression increased in gills and hepatopancreas in response to salinity changes and metals exposure as Cu^{2+} and Zn^{2+} [10]. Similarly, in the mussel *Perna perna*, GPx4 enzymatic activity increased after cadmium, cooper, iron, and lead exposure in the digestive gland [11], and in the oriental river shrimp *Macrobrachium nipponense*, GPx4 expression increased after 12 h of hypoxia in gills and hepatopancreas [12].

The antioxidant responses to stress can be regulated by transcription factors depending on the cellular context. Although some of the genes and proteins involved in the different stress responses of the molecular oxygen sensor pathway are known [13,14], deep understanding about many others remains unclear in crustaceans. The p53 protein is a transcription factor that transactivates a wide range of genes involved in stress responses. Genes or proteins involved in cell cycle arrest, DNA-repair and senescence that are regulated by p53 are among the most studied [15], but recent studies also report p53 as regulator of antioxidant genes in vertebrates [16–20] and a few more suggest that this also occurs in invertebrates [21,22]. In the shrimp *Panaeus monodon*, p53 silencing decreased GPx4 expression and interestingly, during exposure to salinity stress the expression of GPx4 and p53 changed in similar manners, suggesting a relationship among them [22]. Likewise in *L. vannamei* p53 silencing decreased MnSOD and GPx expression, also suggesting that these genes might be regulated by p53 [21]. To our knowledge, GPx4 has not been studied in *L. vannamei*. Thus, the aim of this work was to characterize GPx4 and evaluate its gene expression during hypoxia and p53 knock-down, to assess the regulatory role of p53 on GPx4 responses in hepatopancreas. Also, carbonylated proteins content as indicator of oxidative stress damage was evaluated.

2. Materials and methods

2.1. GPx4 nucleotide sequence analysis

For nucleotide sequences analyses, *L. vannamei* GPx4 genomic and predicted mRNA sequences were obtained from the white shrimp genome database (BioProject: PRJNA508983) (Table 1). All GPx4 nucleotide cDNA sequences were experimentally verified by sequencing. For GPx4 transcript variants (TVs) sequencing, different fragments were amplified from hepatopancreas cDNA using specific forward primers (Table 2), since each TV mainly differ in the sequence of their first non-coding exon. PCR reactions were done using the PCR Master Mix 2x (Thermo Scientific, California, USA) and a 250 nM primers concentration, each reaction was adjusted to a final volume of 20 μL and submitted to the following cycling conditions: 95 °C, 3 min (1 cycle), 95 °C, 1 min, 58 °C, 1 min, 72 °C, 30 s (35 cycles) and one final extension cycle at 72 °C for 5 min. All the amplicons were cloned in the pGEM®-T Easy vector (Promega, Wisconsin, USA) in *Escherichia coli* TOP10 competent

Table 1
Nucleotide and predicted protein sequences of GPx4 in the white shrimp genome.

Gene ID locus	GenBank Accession no.	Transcript variant	Protein	Isoform	Length (aa)
LOC113800343	XM_027351097.1	1	XP_027206898.1	X1	188
LOC113800343	XM_027351106.1	2	XP_027206907.1	X2	162
LOC113800343	XM_027351115.1	3	XP_027206916.1	X2	162
LOC113800343	XM_027351123.1	4	XP_027206924.1	X2	162
LOC113800343	XM_027351132.1	5	XP_027206933.1	X2	162

Table 2
Primers used for GPx4 nucleotide sequence analyses and RT-qPCR reactions.

Primer	Sequence (5'–3')
GPx4FwTV3	CACACTACTCTCTCCATCTTG
GPx4FwTV2	AAGCACTGGGTGTGCTCAG
GPx4FwTV4y5	CGCAATCTGAAAACAACACCC
GPx4Rv6	GTCTTACATATACTTTGGAGGTC
FwGPx4AIIIV	TCATGGCTTCAGAGTCAGCC
GPx4Rv2	CAGCGTGAACACACCGAGT
L8F2	TAGGCAATGTCATCCCAT
L8R2	TCCTGAAGGAGCTTTACACG

cells and sequenced in the Laboratory of Genomic Services LAN-GEBO of CINVESTAV using universal plasmid-specific primers. The sequences obtained were analyzed with the Unipro UGene V.33 software, while the promoters and consensus sequences search in the GPx4 gene were done in the TRANSFAC® software from genexplain (<https://portal.genexplain.com/cgi-bin/portal/login.cgi>).

2.2. Amino acid sequence analysis

The GPx4 amino acid sequences were deduced from the cDNA nucleotide sequences obtained. Protein sequences comparisons with other GPx4 of vertebrates and invertebrates were done by multiple sequence alignment in Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) and edited with the BioEdit 7.2.6.1 software. Data of the sequences used for the multiple sequence alignment are detailed in Table 3. The catalytic residues of GPx4 were identified using the InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/jinterpro/search/sequence/>), while the peptide signals search was done with Phobius (<https://phobius.sbc.su.se/>) and TargetP-2.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>).

2.3. Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis was performed in MEGA-X 10.0.5 with a total of 25 amino acid GPx sequences from invertebrates. The best-fit model of amino acid substitution was obtained using the maximum likelihood (ML) method and the WAG model with a discrete Gamma distribution (+G) was selected for tree construction. Each node was determined from 1000 bootstrap replicates and the tree was rooted to *E. coli* GPx amino acid sequence.

2.4. Homology modelling of the GPx4 protein

The GPx4 protein structure was modeled by homology in the Phyre2 server (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~#x223C;phyre2/html/page.cgi?id=index>) [23], using as template the crystal structure of the phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase wildtype form (apo) of human GPx4 with Se-Cys46 (PDB: 6HN3) that shares an identity of 65.81% with the GPx4 of *L. vannamei*. The three-dimensional (3D) model was visualized and edited with PyMOL Molecular Graphics System 2.0.7.

Table 3
Sequences included in the multiple protein alignment.

Organism scientific name	GenBank Accession no.	Isoform	Organism scientific name	GenBank Accession no.	Isoform
<i>Penaeus vannamei</i>	XP_027206898.1	1	<i>Chanos chanos</i>	XP_030629352.1	–
<i>Penaeus vannamei</i>	XP_027206907.1	2	<i>Gallus gallus</i>	AAM18080.2	–
<i>Penaeus monodon</i>	APM86331.1	–	<i>Homo sapiens</i>	NP_001034937.1	C
<i>Macrobrachium nipponense</i>	QH05100.1	–	<i>Mus musculus</i>	NP_001032830.2	B
<i>Scylla paramamosain</i>	AIW42687.1	–	<i>Dermacentor variabilis</i>	ACF35507.1	–

2.5. Experimental organisms and hypoxia and p53 silencing assay

The hypoxia bioassay and silencing of p53 was previously reported by Nuñez-Hernandez et al. (2021) [24]. Briefly, a fragment of 695 bp of the *L. vannamei* p53 coding sequence (GenBank number KX179650) was used to obtain single stranded RNA (ssRNA) sense and antisense using the T7 RiboMAX Large Scale RNA Production System (Promega, Madison, WI, USA). The dsRNA was obtained by hybridization of equal amounts of the sense and antisense ssRNA heated at 80 °C for 10 min and cooled down slowly at room temperature. The hybridization was verified by 2% agarose gel electrophoresis. The dsRNA was stored at –20 °C until the silencing assay.

The animals used were obtained as post-larvae from a commercial farm in Sonora, Mexico, and transported to the Laboratory of Marine Invertebrates Physiology at CIAD and grown until they reached a juvenile stage. Shrimp were placed in 100 L tanks filled with seawater (28 ± 1 °C, 35 ± 1% salinity, 5 ± 1 mg O₂/L) and fed daily with three rations of a commercial shrimp feed corresponding to 3% of their wet weight. Feces and residual food were removed from the tanks to maintain the quality of the water. The seawater was fully exchanged each time that ammonia concentration overpassed 3.0 mg/L.

For the hypoxia and p53 silencing assay, 240 healthy juvenile shrimp (8.69 ± 0.80 g) were employed. Before the experiment, shrimp were re-distributed in aquaria (15 organisms per tank) filled with 50 L of seawater (28.24 ± 0.48 °C, 35 ± 1% salinity) under normoxia (5.04 ± 0.17 mg O₂/L). The animals were fed every day with a commercial diet corresponding to 3% of their wet weight until the assay. The experimental treatments assigned to each aquarium were normoxia (5.04 ± 0.17 mg O₂/L), normoxia silenced with p53 dsRNA (dsp53), hypoxia (1.05 ± 0.09 mg O₂/L) and hypoxia with dsp53. The animals assigned to the silenced p53 treatments were intramuscularly injected 24 h before starting the hypoxia assay with a sterile syringe with 1 µg of p53 dsRNA per gram of body weight, dissolved in 100 µL of sterile saline solution (SS) (20 mM Tris, 400 mM NaCl, pH 7.5), while non-silenced treatments were injected with SS only. Each treatment had four different sampling times: 1, 6, 24 and 48 h. For hypoxia establishment, nitrogen gas was bubbled in the aquarium to reach a dissolved oxygen concentration (DO) of 1.05 ± 0.09 mg O₂/L; and then the DO was monitored each hour with a portable oximeter ProODO (YSI, Yellow Spring, OH, USA) and adjusted when necessary, by regulating air and nitrogen supply. At the end of each treatment, six shrimp of each experimental condition were dissected to collect gills, muscle and hepatopancreas. A portion of each tissue (~50 mg) was placed in a microtube with ten volumes of TRIreagent (Bioline, London, UK) for RNA extraction, while for carbonylated proteins quantification, a portion of hepatopancreas was placed in an empty microtube. The samples were immediately frozen in a dry ice/ethanol (96%) bath and stored at –80 °C until their analysis.

2.6. RNA isolation and GPx4 mRNA quantification by RT-qPCR

For GPx4 expression analysis, total RNA was isolated from gills,

hepatopancreas, and muscle of non-silenced shrimp kept under normoxic conditions (n = 5), while hepatopancreas was selected for analysis (n = 5) of hypoxia effect on GPx4 expression during p53 silencing, due to its key role in detoxification and redox homeostasis in shrimp [4,25]. Total RNA isolation was performed following the recommendations of TRIreagent (Bioline) protocol. The integrity of the total RNA was verified by 1% agarose gel electrophoresis and concentration and purity were evaluated by absorbance at 260 nm and the 260/280 ratio in a NanoDrop One spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). For elimination of residual genomic DNA, DNase I (Roche, Mannheim, Germany) was used for the treatment of total RNA. Two cDNA reactions for each total RNA sample were performed from 500 ng using the QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen, Valencia, CA, USA).

GPx4 gene expression was evaluated in duplicates of each cDNA by qPCR with the specific primers FwGPx4AllTv and GpX4Rv2 (147 bp product) (Table 2). Previously, a high efficiency of p53 silencing (76.6–95.4%) was reported for the animals employed in this study [24]. For data normalization, gene expression of L8 ribosomal protein was measured as reference gene with the specific primers L8F2 and L8R2 (166 bp product) (Table 2). The qPCR reactions were performed with the 5x HOT FIREPol EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Estonia) at a final volume of 15 µL using as template 1 µL of cDNA (equivalent to 50 ng of total RNA) and primers concentration of 325 and 1000 nM for GPx4 and L8, respectively. All qPCR analyses were performed in a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with the following running conditions: 95 °C, 12 min (1 cycle); 95 °C, 15 s, 58 °C, 20 s, 72 °C, 30 s (40 cycles). At the end of each RT-qPCR run, a melting curve from 65 to 95 °C with increases of 0.3 °C each 5 s was performed to verify the specificity of the reaction by measuring the change in fluorescence. Negative controls (no template) were included to discard reagents contamination. The efficiency of the reactions was determined by running standard curves ranging from 2.5 × 10¹ to 4.0 × 10⁻² ng/µL of cDNA. GPx4 relative expression was calculated by the 2^{-ΔCq} method [26].

2.7. Carbonylated proteins quantification

Carbonylated proteins content was quantified as a proxy to evaluate the oxidative damage to proteins during hypoxia and p53 knock-down. For the determinations, crude extracts from hepatopancreas (68.4 ± 28.7 mg; n = 5) were prepared. The tissues were homogenized in 1:10 (w/v) in sodium phosphate buffer (0.075 M Na₂HPO₄, 0.025 M NaH₂PO₄, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF; pH 7.6), with a manual homogenizer (Kontes™ Pellet Pestle™ Cordless Motor) and centrifugated at 9000×g for 15 min at 4 °C. The supernatants (crude extracts) were collected and used for carbonylated proteins and protein concentration quantification. Carbonylated proteins determinations were performed by duplicated in each sample using the assay kit (MAK094, Sigma-Aldrich, Castle Hill, Australia) according to the supplier's recommendations. Briefly, carbonylated proteins were evaluated by detection of the dinitrophenylhydrazine (DNP) adducts that are produced by derivatization of carbonyl groups in proteins with 2,4-dinitrophenylhydrazine

(DNPH) and are proportional to carbonylated proteins present in the sample. DNP detection was performed spectrophotometrically at 375 nm in a Multiskan Sky microplate spectrophotometer (Thermo Scientific). Protein content in the samples was determined by the Pierce method based on bicinchoninic acid (BCA), using bovine serum albumin for the standard curve. Protein carbonyl content was expressed as the amount of protein carbonyls in nmol per mg protein (nmol/mg protein).

2.8. Statistical analysis

Normality of data and variance equality were determined by D'Agostino Kurtosis test and Levene's tests, respectively. The statistical differences in GPx4 expression among each tissue were analyzed by one-way ANOVA, while the effect of p53 silencing during hypoxia in GPx4 expression and carbonylated proteins content was determined with a Two-way ANOVA with a factorial design 2×2 . The variation factors were the shrimp silencing (ds) with two levels, p53 silenced (dsp53) and non-silenced (SS) and the dissolved oxygen (DO) condition at two levels, normoxia (N) and hypoxia (H); also, the interaction DO \times ds was tested. Mean comparisons were done by the Tukey-Kramer multiple comparison test with a $p < 0.05$. Time as a variable was not considered in this study, thus a normoxic control was included at each tested time. Data were plotted in the software GraphPad Prism version 5 as mean \pm standard error of the mean (SEM).

3. Results

3.1. The white shrimp GPx4 gene has five transcript variants

L. vannamei as other organisms, has an antioxidant battery that comprises distinct enzymes. However, to our knowledge, there is only one report of GPx in this shrimp species until now [27]. By analyzing the nucleotide sequences of the *L. vannamei* genome recently available, but not completely annotated [2], the search for GPx revealed that the shrimp has several GPxs enzymes, including one GPx4. We found a unique GPx4 gene with 6 exons interrupted by 5 introns that gives rise to five transcript variants (TV1-5) that differ in the length of their first non-coding exon (Fig. 1). All GPx4 transcript variants were experimentally verified by sequencing and submitted to GenBank annotated in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) with the following accession numbers: GPx4TV1Lv, OL630777; GPx4TV2Lv, OL630778; GPx4TV3Lv, OL630779; GPx4TV4Lv, OL630780 and GPx4TV5Lv, OL630781. GPx4 TV1 has a coding region (CD) of 566 bp that is translated into 188 amino acids, while GPx4 TV2-5 share the same ORF of 488 bp that corresponds to 162 amino acids; the difference corresponds to an extension of 26 amino acid residues in the N-terminal derived protein from GPx4TV1. Therefore, only two proteins isoforms are produced from the same GPx4 gene, GPx4 X1 and GPx4 X2.

GPx4 gene promoter analysis by Match in the TRANSFAC® software, returned one putative site in the first intron at position 2910 bp (Fig. 1). It is probable that this promoter directs the transcription of GPx4TV3 since its first exon is produced from a region that for the other TVs, is part of the first intron. Regarding the GPx4 TV 2–5 promoter, it could not be identified by *in silico* analysis. Additionally, putative consensus sequences for the binding of transcription factors were identified. The consensus sequence ACGTG for HIF-1 α was found 16 bp upstream of the translation initiation codon of the TV1 on the coding strand while putative response elements for proteins of the p53 family such as p53 and p63 were found downstream (Fig. 2).

3.2. Amino acid sequence analysis

Amino acid sequences analysis was performed for the two *L. vannamei* GPx4 isoforms. As we expected, GPx4 X1 and X2 share high identity (86.1%) since the only difference is the 26 amino acid residues extension in the N-terminal. The search for signal peptide indicated that the GPx4 X1 isoform, unlike the GPx4 X2, has in the N-terminus a signal peptide composed of 28 amino acids that directs GPx4 X1 to mitochondrial localization (Fig. 3). The multiple amino acid sequences alignment with other organisms showed that the GPx4 proteins are highly conserved proteins. *L. vannamei* GPx4 isoforms identity values were from 40.1% to 98.7% with respect to diverse vertebrates and invertebrate amino acid sequences, while as expected, the highest identities were with other crustaceans as *P. monodon* (85.1%), *M. nipponense* (70.3%), *Scylla paramamosain* (62.6%), and the insect American dog tick *Dermacentor variabilis* (58.1%), respect the *L. vannamei* GPx4 X1 isoform. Similarly, GPx4 X2 presented the highest identity with other invertebrate amino acid sequences as *P. monodon* (98.7%), *M. nipponense* (81.5%), *S. paramamosain* (71.6%), and *D. variabilis* (67%). Both, GPx4 X1 and GPx4 X2, share the lowest identity with vertebrate sequences that were from 40.1% to 63.1%.

The catalytic residues of the *L. vannamei* GPx4 were found embedded in the conserved motifs $Gx_6NvAx_2U(C)g$ towards the N-terminus, $fPcnQFgxq$ a few residues downstream and the $WNFxxlxlvx_3Gx_2vxry$ towards the C-terminus at positions U⁶⁵, Q¹⁰⁰, and W¹⁵³, in the GPx4 X1 and U³⁹, Q⁷⁴, and W¹²⁷ in GPx4 X2 (Fig. 3). Selenocysteine (Sec) was identified as the redox-active catalytic residue in both, GPx4 X1 and X2, confirming that the shrimp GPx4 is a selenoprotein.

3.3. Homology modeling of the GPx4 protein

The *L. vannamei* GPx4 3D protein model was predicted by homology from the crystallographic structure of the phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase wildtype form (apo) of human GPx4 with Se-Cys46 at 1.01 Å of RMSD value (Fig. 4). The structure obtained was feasible since Ramachandran plots favored the protein structure in 96.62%. In *L. vannamei* as in other organisms, the GPx4 protein has a monomeric structure that fits with the characteristic thioredoxin folding that is common in proteins that interact with substrates that possess a thiol or a disulfide group, such as thioredoxins, glutaredoxins, glutathione-S-transferases, DsbA, and glutathione peroxidases [28]. The *L. vannamei* GPx4 protein structure consists of a central four-stranded β -sheet and two peripheral, flanked by six α -helix. These structures form together the characteristic fold of the thioredoxin proteins with the β 3 and β 4 running in parallel while β 5 and β 6 are antiparallel (Fig. 4A). The catalytic residues identified in the 3D structure were the redox-active Sec⁶⁵ found in the loop prior the α 3 helix, and the Gln¹⁰⁰ and Trp¹⁵³ localized in the loops before the α 4 helix and β 5 sheet, respectively. This spatial distribution leaves the catalytic triad in proximity for their interaction (Fig. 4B and C).

3.4. Phylogenetic analysis

The phylogenetic tree construction was done with 25 GPxs protein sequences of invertebrates (Fig. 5). The white shrimp GPx4 isoforms appear to be more closely related to GPx7 than to GPx1-6 of invertebrates, since the clustering of the sequences in the phylogenetic tree presented two main clades. One clade mostly grouped the tetrameric GPxs as GPx1-3,5 and 6, supported by a bootstrap value of 93%; another clade clustered the sequences of GPx4 and GPx7 that are monomeric proteins (bootstrap value of 86%).

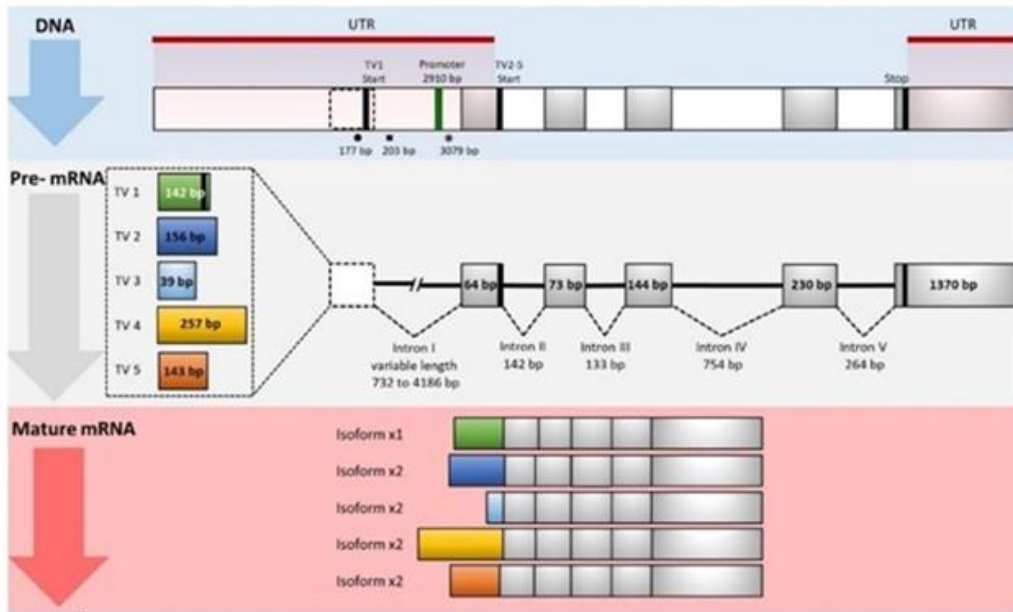


Fig. 1. Diagram of *L. voronaei* GPx4 gene structure and transcripts variants. Exons are represented by gray boxes and introns by dotted lines. Exon 1 is represented with dotted border boxes in description of variable length. Color boxes represent GPx4 transcription variants (TV). Response elements for ●: HIF-1 α , ■: p63 and * : p53 are indicated below the gene map.

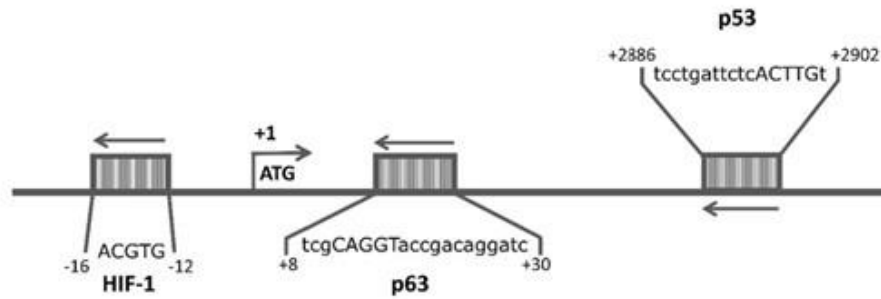


Fig. 2. Regulatory elements in the GPx4 gene. Only the regulatory sequences relevant to this study are shown. The orientation of the response elements is indicated by arrows. The initial ATG methionine codon is indicated with number 1.

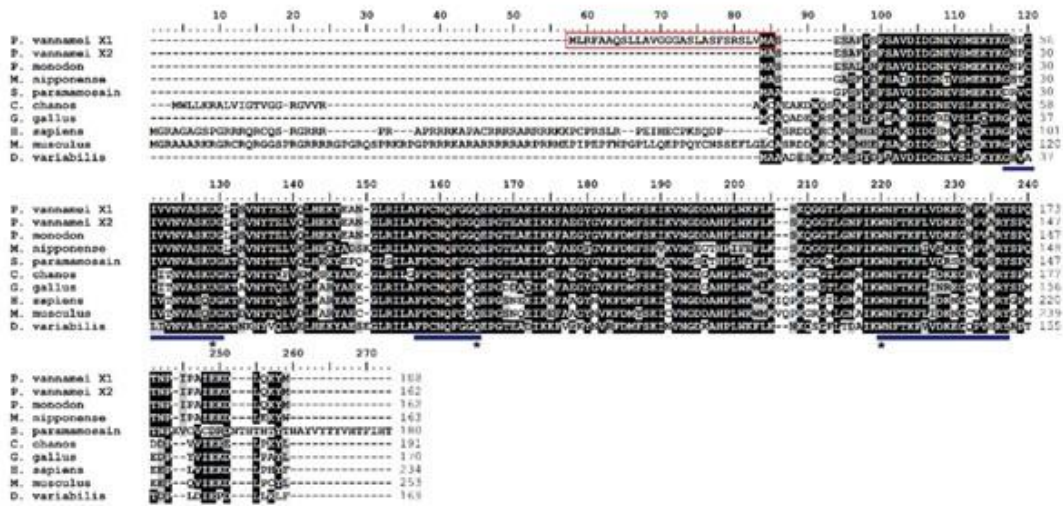


Fig. 3. Multiple alignment of GPx4 amino acid sequences. The conserved motives of the GPx family proteins are underlined. The residues inside the red box correspond to the predicted mitochondrial signal peptide. * Indicates the position of the catalytic residues.

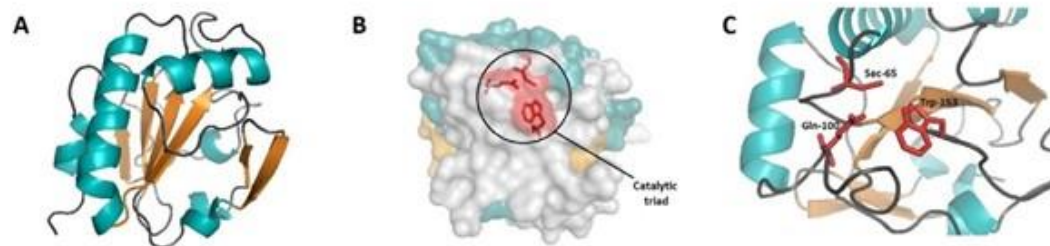


Fig. 4. GPx4 Homology model. A: GPx4 monomer 3D homology model; B: Surface exposure of the catalytic triad U⁶⁵, Q¹⁰⁰ and W¹⁵³(circled region); C: Catalytic triad arrangement in the active site. Amino acid positions are relative to the initial methionine.

3.5. Tissue distribution of GPx4

Tissue expression patterns of GPx4 in the white shrimp were analyzed by RT-qPCR in gills, muscle, and hepatopancreas since these tissues have high metabolic rates and are more susceptible to oxidative damage. The basal expression analysis in these tissues showed a higher expression of GPx4 in hepatopancreas followed by gills with a 14.98-fold lower expression (Fig. 6A) ($p < 0.05$), while in muscle, GPx4 expression could not be detected.

3.6. Effect of hypoxia and p53 silencing on GPx4 gene expression

The hypoxia effect in GPx4 expression was evaluated in hepatopancreas since this organ plays a key role in redox homeostasis maintenance [25,29]; and also, this tissue has higher basal expression compared to gills and muscle. GPx4 expression was evaluated at four different times 1, 6, 24 and 48 h to assess early and late responses to hypoxia in p53 silenced and non-silenced shrimp. GPx4 expression did not present significant changes after 1 h

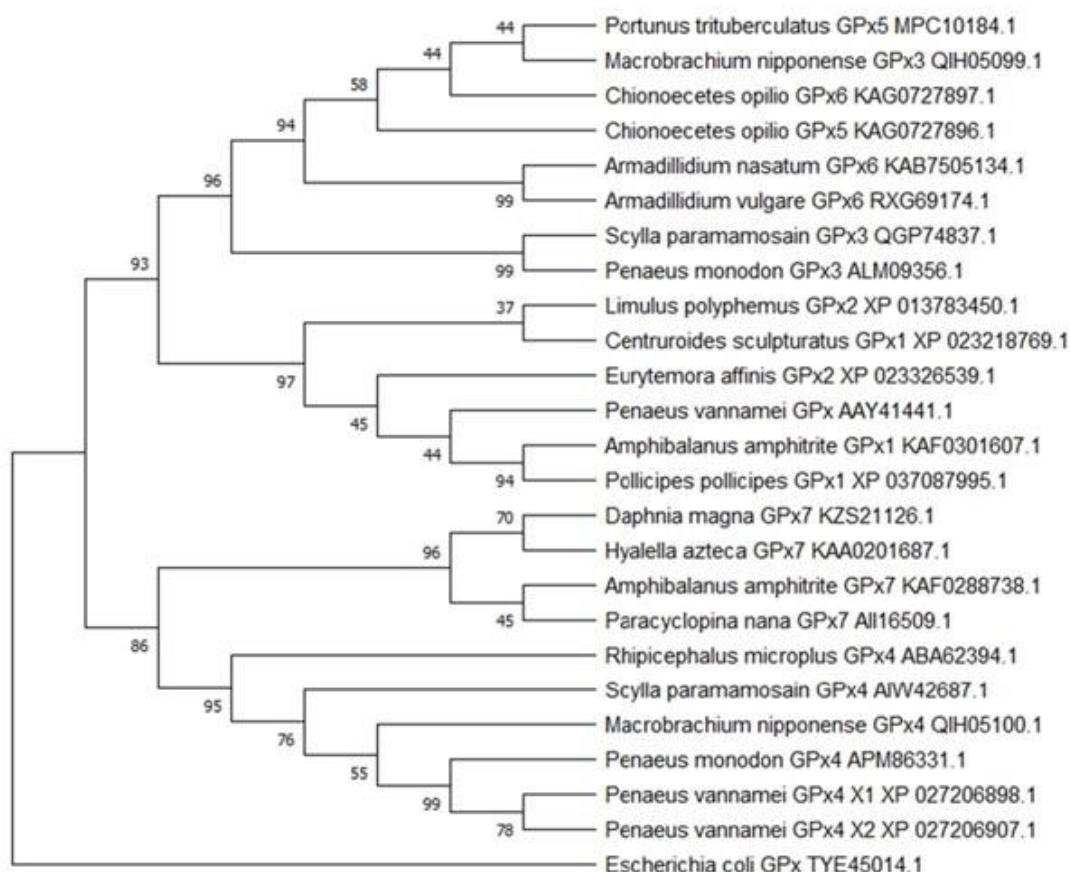


Fig. 5. Phylogenetic tree of GPx sequences from various invertebrate species. The phylogenetic analysis was performed by the Maximum Likelihood method with the WAG + G model. The numbers at each branch indicate the bootstrap percentage supporting that branch, calculated from 1000 replicates.

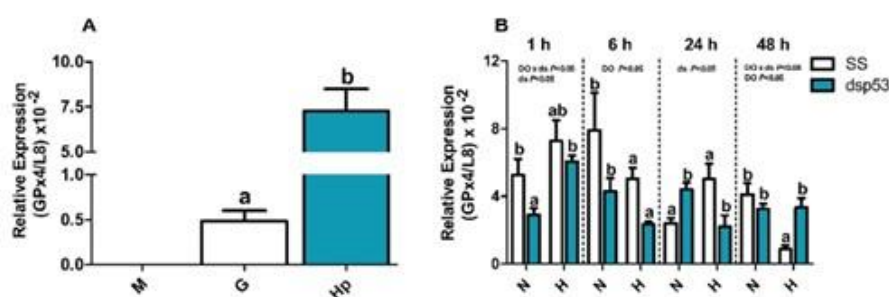


Fig. 6. Expression of GPx4. Panel A: basal expression in muscle (M), gills (G) and hepatopancreas (Hp). Panel B: effect of hypoxia and p53 knock-down in hepatopancreas. Data are shown as mean \pm SEM (n = 5). Different letters indicate statistical differences ($p < 0.05$). Time as a variable was not considered in this study, thus a normoxic control was included at each tested time.

hypoxia in non-silenced shrimp although expression was 1.38-fold more with respect to the normoxia control ($p > 0.05$), while silenced shrimp had an expression of 2.08-fold higher than its silenced control in normoxia after 1 h of hypoxia ($p < 0.05$) (Fig. 6A). Conversely, after 6 h, GPx4 expression decreased in both, silenced and not silenced shrimp during hypoxia 1.56 and 1.83-fold compared to the normoxic controls, respectively ($p < 0.05$). GPx4 expression tended to increase in non-silenced shrimp to 2.08-fold

with respect to the normoxic control during long term hypoxia of 24 h ($p = 0.06$). Interestingly, the opposite occurred in silenced shrimp, with GPx4 expression 1.99-fold less with respect to the silenced normoxia control after 24 h of hypoxia ($p = 0.06$). Finally, after 48 h non-silenced animals presented a significant reduction of 4.68-fold in GPx4 gene expression during hypoxia ($p < 0.05$), a stronger effect compared to the results of 6 h (Fig. 6B).

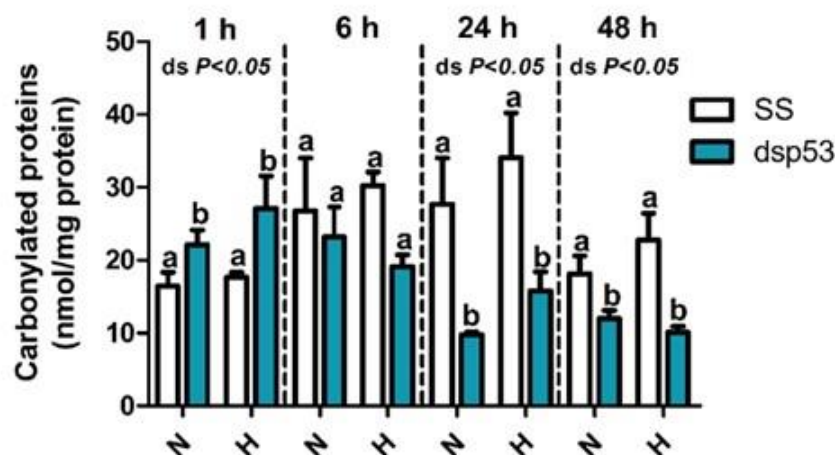


Fig. 7. Effect of hypoxia and p53 knock-down in carbonylated proteins content in hepatopancreas. Data are shown as mean \pm SEM ($n = 5$). Different letters indicate statistical differences at each time ($p < 0.05$). Time as a variable was not considered in this study, thus a normoxic control was included at each tested time.

3.7. Carbonylated proteins accumulation during hypoxia and p53 knock-down

Carbonylated proteins content was analyzed to evaluate the oxidative damage induced by hypoxia exposure in p53 silenced and non-silenced shrimp, since carbonylated protein accumulation is the most general indicator of protein oxidation and oxidative damage [30]. Carbonylated proteins content did not present changes by effect of hypoxia compared to normoxia in both, silenced and non-silenced shrimp ($p > 0.05$). However, p53 knock-down induced significant changes in carbonyls content regardless of oxygenation conditions. At the first hour, the accumulation of carbonylated proteins was higher in p53 silenced shrimp, but the concentrations decreased after 24 h and remained low until 48 h in comparison to the non-silenced shrimp ($p < 0.05$) (Fig. 7).

4. Discussion

4.1. In *L. vannamei* two selenodependent isoforms of GPx4 are transcribed from one unique gene

GPx4 has emerged as one of the most important selenoproteins in vertebrates with multiples functions due to its substrate promiscuity and its activity as moonlight protein [31–33], however, in invertebrates GPx4 has not been studied in depth. In the white shrimp, a unique GPx4 genomic sequence was identified from the genome database and as in the vertebrates GPx4 gene, different TVs are produced that yield two GPx4 protein isoforms. This strategy may be relevant for regulation of the GPx4 protein synthesis, since the quantity of TVs produced from a given gene has been associated to its importance in humans, where genes with more TVs mainly fulfill roles as housekeeping and essential genes [34]. In agreement, the *L. vannamei* GPx4s seem to be a highly conserved selenoproteins, since both isoforms, GPx4 X1 and GPx4 X2, share high identity in primary sequence with the homologs from vertebrates and invertebrates as shown in the multiple alignment analysis. Also, the catalytic triad Sec, Gln and Trp was found embedded in highly conserved motifs (Fig. 3) and the protein homology model showed the proximity of the catalytic residues key for the enzyme activity where Gln and Trp contribute to the activation of the Sec and facilitate the cleavage of the hydroperoxy bond and dissociation of the thiol group [35,36]. Furthermore, the Sec residue

conservation ensures the enzyme function since its mutation leads to loss of enzyme function in selenodependent GPxs [37,38].

4.2. The evolutionary closeness of GPx proteins in *L. vannamei* is similar to vertebrates

The phylogenetic tree distribution clustered the GPx sequences in two main clades that separate the tetrameric from monomeric GPx isoforms. The tree indicated that the two *L. vannamei* GPx4 isoforms are more closely related to GPx7 than to GPx1-6 from other invertebrates. In addition, GPx 4 and 7 appear to diverge very early during evolution from the other GPx proteins. The conservation among GPxs protein sequences and their function point to a sub-functionalization of GPx4 [39], and the changes prompted distinctive catalytic functions of GPx4 as a reductant of phospholipid hydroperoxides and as moonlight protein in vertebrates, and the same could have occurred in invertebrates since these similarities were found in the present study.

In vertebrates, it is thought that many GPx selenoproteins evolved to generate new isoforms. A phylogenetic study by Margis et al. (2008) [39] pointed out that GPx5 and GPx6 arose from the successive duplication of GPx3. Similarly, other evolutionary studies suggested that GPx7 arose from an ancestor of GPx4 [40,41]. Our findings in the phylogenetic analysis of GPxs, suggest that the evolutionary path of these enzymes in *L. vannamei* could have been analogous in vertebrates, and after the duplication events GPx4 and 7 diverged from GPx1-6.

4.3. Tissue abundance of GPx4 mRNA

Due to its importance in membranes protection in most organisms, GPx4 is widely expressed. Herein we analyzed GPx4 expression in muscle, gills, and hepatopancreas, because they are highly metabolic active tissues in shrimp. GPx4 expression was detected in hepatopancreas with the highest expression, followed by gills and was undetectable in muscle. There are still many aspects of the selenoproteome and its role in many biological dynamics that are not fully elucidated in crustaceans; however, the current knowledge about the biological role of selenium and selenoproteins in vertebrates led us to hypothesize that these proteins functions are similar. The crustacean hepatopancreas resembles many of the vertebrate functions of liver. In mammals, selenium is

accumulated mainly in the liver and incorporated in many selenoproteins, as occurs with Sel P [42]. In mice, selenoproteins are expressed in several organs with differences in expression. In the liver, Sel P and GPx4 are highly expressed [43]. Similarly, *L. vannamei* could express high levels of selenoproteins as the GPx4 in hepatopancreas. Moreover, hepatopancreas high metabolic rate makes it more susceptible to oxidative damage compared to other more resilient tissues [4]. Thus, GPx4 high expression might be of utmost importance to maintain redox homeostasis and tissue integrity in this organ. Likewise, in *P. monodon*, hepatopancreas has higher GPx4 expression compared to other tissues as muscle, brain, and ovary [10].

In contrast, *L. vannamei* GPx4 expression was undetectable in muscle. In other organism such as the bluefin tuna *Thunnus maccoyii* [44], *M. nipponense* [12] and *P. monodon* [10] GPx4 is expressed in muscle at low levels. Although all tissues can synthesize selenoproteins, their specific requirements are different, thus, selenium availability is under regulation. In vertebrates, two receptors from the family of low-density lipoproteins, the Sepp1 and the apolipoprotein E receptor-2 (apoER2), facilitate selenium endocytosis. These receptors are differentially distributed among tissues and in muscle, their expression is lower than in other organs [45]. Similar tissue distribution patterns of selenium could occur in crustaceans, since GPx4 expression in *L. vannamei* muscle was undetectable.

4.4. p53 knock-down and hypoxia affects GPx4 expression in shrimp

The antioxidant enzyme GPx4 recently has emerged as a suitable indicator of oxidative stress, loss of antioxidant homeostasis and alteration of cellular integrity [31,46]. However, in crustaceans, its response mechanism to different stressors remains poorly understood. In the present study we focused on the GPx4 responses during hypoxia in the white shrimp, and also aimed to investigate the role of p53 as regulator of the antioxidant response of GPx4 under low DO. The hepatopancreas is a very responsive organ in shrimp, since several biochemical and physiological changes can be detected during hypoxic stress as other studies report [4,6,47]. In concordance with these studies, changes in GPx4 expression were detected in hepatopancreas of p53 silenced and non-silenced shrimp during the elapsed times of hypoxia exposure.

During the first hour of hypoxia, GPx4 expression tended to increase in non-silenced shrimp, while in silenced shrimp the increase was clear. In living organisms, the ability to adapt or maintain the response is determinant for resilience during hypoxia and one of the first adaptive responses is a concomitant rise in antioxidant genes expression [48,49]. In *L. vannamei* initial GPx4 changes after 1 h of hypoxia may correspond to an initial response to adapt to oxygen limitation. On the other hand, although p53 silenced shrimp presented similar expression patterns at 1 and 6 h, in general, gene expression levels were lower than those found in non-silenced organisms, suggesting that p53 knock-down may decrease GPx4 expression. As transcription factor, p53 regulates expression of many genes responsive to stress, as in the case of pro-oxidant and antioxidant genes [15,16]. Thus, we suggest a regulator function of p53 on GPx4 gene expression based on the remarkably GPx4 down-regulation exhibited by p53 silenced shrimp. These findings are strengthened by our *in silico* analysis of GPx4 nucleotide sequences where p53 and p63 regulative consensus sequences in the GPx4 gene promoter were found. In this sense, GPx4 down-regulation in p53 silenced organisms may be due to a low activation of transcriptional response of antioxidant genes caused by the p53 knock-down. Similarly, in *P. monodon* and *L. vannamei*, GPx4 and GPx and MnSOD expression, respectively, decreased after p53 silencing [21,22].

In contrast to the initial responses to hypoxia, GPx4 gene expression decreased significantly after 6 h of hypoxia in both, silenced and non-silenced shrimp. It is possible that after 1 h of hypoxia exposure, important shifts in shrimp responses occurred due to a higher stress generated by a prolonged hypoxia exposure that led to a metabolic suppression. This is one of the most common responses to prolonged hypoxia that leads to reduction of transcription rate and protein synthesis as a biological strategy for energy conservation [50]. Thus, abrupt decrease in GPx4 expression was detected after 6 h of hypoxia. Similarly, in another study, *L. vannamei* GPx expression in hepatopancreas presented an initial up-regulation after 4 h of hypoxia exposure, but after 24 h it was down-regulated [51]. Likewise, in this same species, cyclic serious medium hypoxia induces a significant decrease in MnSOD and GPx expression in hepatopancreas and midgut after 1 day of exposure [47].

Concerning GPx4 expression, after 24 h of hypoxia this tended to increase in non-silenced shrimp and to decrease in p53-silenced shrimp in response to hypoxia. In non-silenced shrimp, this is similar to the response after 1 h of hypoxia. Comparable outcomes were reported for GPx4 expression in hepatopancreas of *M. nipponense* after 24 h of hypoxia [12]. Interestingly, this increase did not occur in p53 silenced shrimp and GPx4 expression remained comparable to the control in normoxia until 48 h of hypoxia, unlike non-silenced animals that presented a drop in GPx4 expression. Recently, it has been reported that the isoforms of p53, Flp53 and ΔNp53, decrease their expression and in consequence total p53, during long term hypoxia of 48 h in *L. vannamei* hepatopancreas [24], and this may lead to a down-regulation of p53 regulated genes. But, it is known that the p53 pathways of regulation are complex and can result in context and tissue dependent responses [15]. At the same time, different interactions with other transcription factors as the hypoxia inducible factor (HIF-1) can be established to redirect some adaptive biological responses to stress [52]. Therefore, further studies that address these complex dynamics could contribute to a better understanding of the regulation of the antioxidant system and GPx4 modulation during stress.

4.5. Accumulation of carbonylated proteins during hypoxia and p53 silencing

Carbonylated proteins accumulation is employed as a good and stable indicator of oxidative stress since protein carbonyl derivatives are rapidly generated during stress and remain chemically stable for detection [30]. Thus, we evaluated the carbonylated protein content at different hypoxia exposure times in p53 silenced and non-silenced shrimp to assess the oxidative damage that is generated under these conditions. Previous reports indicate that elevation and accumulation of carbonylated proteins can occur during hypoxia and heat stress in *L. vannamei* [53,54]. However, those results differ from our findings, since there were no significant changes in carbonylated proteins content detected in hypoxia, indicating that oxidative stress remains well-modulated by the antioxidant defense system of shrimp, during the exposure to 1, 6, 24 and 48 h of hypoxia. Herein, we reported that GPx4 presented an active response to hypoxia, in which GPx4 expression was up-regulated from the first hour of hypoxia exposure and this might have contributed to the maintenance of redox homeostasis in the white shrimp. Lu et al. (2009), reported that GPx4 over-expression protected retinal pigment epithelium (RPE) cells from oxidative damage after exposure to paraquat, H₂O₂ and O₂ by decreasing carbonylated proteins content; in contrast to over-expression of other antioxidant proteins as SOD 1 and 2, in which carbonylated proteins content was increased remarking the antioxidant effect of GPx4 [55].

On the other hand, p53 knock-down induced significant changes in carbonylated proteins content in *L. vannamei* hepatopancreas. p53 regulates a large group of pro-oxidant and antioxidant proteins depending on their cellular context. Thus, during p53-knockdown its responses can be altered and induce oxidative changes that can be detected by oxidative damage markers as the carbonylated proteins content. During the first hour, carbonylated proteins content was higher in silenced shrimp compared to non-silenced. Also, after 1 h GPx4 expression was lower in silenced shrimp in contrast to non-silenced regardless of oxygenation condition. These responses indicate that GPx4 down-regulation during p53 knock-down results in higher carbonylated proteins content. Besides, it is probable that responses of other p53 regulated pro-oxidant and antioxidant genes that were modified during p53 silencing contributed to oxidative damage and carbonylated proteins elevation in hepatopancreas. Some of p53 regulated antioxidant genes previously reported in mammals are GPx, MnSOD [20], GPx1, SESN1, SESN2 [16] and GPx2 [18] just to name a few. Interestingly after 24 h, p53 knock-down shrimp had a significantly decrease in carbonylated proteins, indicating that oxidative stress damage was reduced from 24 to 48 h in shrimp hepatopancreas.

5. Conclusions

GPx4 is considered one of the most important members of the GPx protein family in mammals. However, in crustaceans there are only a few reports about its biological implications and responses against stress conditions. Herein we address this gap of information providing knowledge about GPx4 gene structure and its products in the white shrimp. Our findings reveal that GPx4 expression changes during hypoxia and that these changes are different in p53 silenced shrimp, suggesting p53 as GPx4 regulator. However, we still are far from elucidating the complete panorama. Therefore, more evidence about GPx4 expression regulation and its consequences in this organism is needed for a broader vision of *L. vannamei* biological dynamics during hypoxia.

Authors contributions

PEC performed the experiments, data analysis and writing of the original draft. The hypoxia and p53 silencing bioassay was designed and performed by LCJ. ABPU supervised the experiments and contributed with important suggestions during the experiments. CACV supervised the GPx4 modeling. JHL gave very useful suggestions during the experiments. GYP designed, directed, and supervised the experiments. All the authors critically revised and edited the manuscript.

Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We are grateful to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Mexico) for grant PN2017/4869 to GYP, for a Ph.D. studies scholarship to PEC and postdoctoral fellowship to LCJ. We thank Dr. Silvia Gómez-Jiménez and her group for the help with the shrimp bioassay.

References

[1] D. Breitburg, L.A. Levin, A. Oschlies, M. Grégoire, F.P. Chavez, D.J. Conley,

- V. Garçon, D. Gilbert, D. Gutiérrez, K. Isensee, G.S. Jacinto, K.E. Limburg, I. Montes, S.W.A. Naqvi, G.C. Pitcher, N.N. Rabalais, M.R. Roman, K.A. Rose, B.A. Seibel, M. Telszewski, M. Yasuhara, J. Zhang, Declining oxygen in the global ocean and coastal waters, *Science* 359 (2018) 1395–1406, <https://doi.org/10.1126/science.aam7240>, 80–.
- [2] X. Zhang, J. Yuan, Y. Sun, S. Li, Y. Gao, Y. Yu, C. Liu, Q. Wang, X. Lv, X. Zhang, K.Y. Ma, X. Wang, W. Lin, L. Wang, X. Zhu, C. Zhang, J. Zhang, S. Jin, K. Yu, J. Kong, P. Xu, J. Chen, H. Zhang, P. Sorgeloos, A. Sagi, A. Alcivar-warren, Z. Liu, Penaeid shrimp genome provides insights into benthic adaptation and frequent molting, *Nat. Commun.* (2019), <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08197-4>.
- [3] C.I. Pérez-Rostro, I.S. Racotta, A.M. Ibarra, Decreased genetic variation in metabolic variables of *Litopenaeus vannamei* shrimp after exposure to acute hypoxia, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 302 (2004) 189–200, <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2003.10.010>.
- [4] P. Estrada-Cárdenas, D.G. Cruz-Moreno, R. González-Ruiz, A.B. Peregrino-Urriarte, L. Leyva-Carrillo, L. Camacho-Jiménez, I. Quintero-Reyes, G. Yepiz-Plascencia, Combined hypoxia and high temperature affect differentially the response of antioxidant enzymes, glutathione and hydrogen peroxide in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*, *Comp. Biochem. Physiol. -Part A Mol. Integr. Physiol.* 254 (2021), <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.110909>.
- [5] R. González-Ruiz, O.N. Granillo-Luna, A.B. Peregrino-Urriarte, S. Gómez-Jiménez, G. Yepiz-Plascencia, Mitochondrial manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: molecular characterization and effect of high temperature, hypoxia and reoxygenation on expression and enzyme activity, *J. Therm. Biol.* 88 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102519>.
- [6] D.P. Parrilla-Taylor, T. Zenteno-Savín, Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation, *Aquaculture* 318 (2011) 379–383, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.05.015>.
- [7] C.H. Travasina-arenas, A. Garcia-triana, A.B. Peregrino-urriarte, G. Yepiz-plascencia, White shrimp *Litopenaeus vannamei* catalase : gene structure , expression and activity under hypoxia and reoxygenation, *Comp. Biochem. Physiol. B* 164 (2013) 44–52.
- [8] A.W. Girotti, Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems, *J. Lipid Res.* 39 (1998) 1529–1542.
- [9] E.V. Pradedova, O.D. Isheeva, R.K. Salyaev, Classification of the antioxidant defense system as the ground for reasonable organization of experimental studies of the oxidative stress in plants, *Russ. J. Plant Physiol.* 58 (2011) 210–217, <https://doi.org/10.1134/s1021443711020166>.
- [10] F. Li, P. Wang, C. Zhao, W. Bao, L. Qiu, Cloning and characterization of PHGPx and its synergistic role with p53 in mediating stress in *Penaeus monodon*, *Fish Shellfish Immunol.* 71 (2017) 380–392, <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.10.018>.
- [11] E.A. De Almeida, S. Miyamoto, A.C.D. Bains, M.H.G. De Medeiros, P. Di Mascio, Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals, *Mar. Pollut. Bull.* 49 (2004) 386–392, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.02.020>.
- [12] L. Xu, M. Yang, H. Fu, S. Sun, H. Qiao, W. Zhang, Y. Gong, S. Jiang, Y. Xiong, S. Jin, Y. Wu, Molecular cloning, expression, and in situ hybridization analysis of MnGPx-3 and MnGPx-4 from oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*, in response to hypoxia and reoxygenation, *PLoS One* 15 (2020) 1–16, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229171>.
- [13] G.L. Semenza, HIF-1: Mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 277 (2000) 1096, <https://doi.org/10.1021/ps00023bt>.
- [14] G.L. Semenza, Hypoxia-inducible factor 1 and the molecular physiology of oxygen homeostasis, *J. Lab. Clin. Med.* 131 (1998) 207–214, [https://doi.org/10.1016/S0022-2143\(98\)90091-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2143(98)90091-9).
- [15] A.V. Budanov, The role of tumor suppressor p53 in the antioxidant defense and metabolism, *Subcell. Biochem.* 85 (2014) 133–159, <https://doi.org/10.1007/978-94-017-9211-0>.
- [16] A.A. Sablina, A.V. Budanov, G.V. Ilyinskaya, L.S. Agapova, J.E. Kravchenko, P.M. Chumakov, The antioxidant function of the p53 tumor suppressor, *Nat. Med.* 11 (2005) 1306–1313, <https://doi.org/10.1038/nm1320>.
- [17] W.J. Mai, J.L. Yan, L. Wang, Y. Zheng, Y. Xin, W.N. Wang, Acute acidic exposure induces p53-mediated oxidative stress and DNA damage in tilapia (*Oreochromis niloticus*) blood cells, *Aquat. Toxicol.* 100 (2010) 271–281, <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.07.025>.
- [18] W. Yan, X. Chen, GPX2, a direct target of p63, inhibits oxidative stress-induced apoptosis in a p53-dependent manner, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 7856–7862, <https://doi.org/10.1074/jbc.M512655200>.
- [19] L. Jiang, J.H. Hickman, S.J. Wang, W. Gu, Dynamic roles of p53-mediated metabolic activities in ROS-induced stress responses, *Cell Cycle* 14 (2015) 2881–2885, <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1068479>.
- [20] S.P. Hussain, P. Amstad, P. He, A. Robles, S. Lupold, I. Kaneko, M. Ichimiya, S. Sengupta, L. Mechanic, S. Okamura, L.J. Hofseth, M. Moake, M. Nagashima, K.S. Forrester, C.C. Harris, p53-Induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis, *Cancer Res.* 64 (2004) 2350–2356, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-2287-2>.
- [21] Z. Qian, T. Liu, Q. Liu, S. He, Y. Liu, F. Hou, X. Wang, X. Mi, C. Cai, X. Liu, P53 is involved in shrimp survival via its regulation roles on MnSOD and GPx in response to acute environmental stresses, *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol.*

- Pharmacol. 159 (2014) 38–51, <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.09.009>.
- [22] F. Li, P. Wang, C. Zhao, W. Bao, L. Qiu, Cloning and characterization of PHGPx and its synergistic role with p53 in mediating stress in *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.* 71 (2017) 380–392, <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.10.018>.
- [23] L.A. Kelley, S. Mezulis, C.M. Yates, M.N. Wass, M.J.E. Sternberg, The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* 10 (2015) 845–858, <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>.
- [24] D. Nuñez-Hernández, L. Camacho-Jiménez, L. Leyva-Carrillo, A.B. Peregrino-Urriarte, E.M. Valenzuela-Soto, S. Gómez-Jiménez, H. González-Ríos, G. Yepiz-Plascencia, Expression of p53 isoforms in response to two levels of hypoxia and effects of p53 knock-down in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Res.* (2021) 1–11, <https://doi.org/10.1111/are.15083>.
- [25] S. Yin Han, M. Qiang Wang, M. Liu, B. Jie Wang, K. Yong Jiang, L. Wang, Comparative sensitivity of the hepatopancreas and midgut in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* to oxidative stress under cyclic serious/medium hypoxia. *Aquaculture* 490 (2018) 44–52, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.021>.
- [26] T.D. Schmittgen, K.J. Livak, Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3 (2008) 1101–1108, <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.
- [27] C. Liu, M. Tseng, W. Cheng, Identification and cloning of the antioxidant enzyme, glutathione peroxidase, of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and its expression following *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 23 (2007) 34–45, <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.09.002>.
- [28] J.L. Martin, Thioredoxin -a fold for all reasons. *Structure* 3 (1995) 245–250, [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00154-X](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00154-X).
- [29] Q. Yu, Z. Fu, M. Huang, C. Xu, X. Wang, J.G. Qin, L. Chen, F. Han, E. Li, Growth, physiological, biochemical, and molecular responses of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed different levels of dietary selenium. *Aquaculture* 535 (2021), <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736393>.
- [30] I. Dalle-Donne, R. Rossi, D. Giustarini, A. Milzani, R. Colombo, Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta* 329 (2003) 23–38, [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00003-2).
- [31] H. Imai, Y. Nakagawa, Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* 34 (2003) 145–169.
- [32] K. Nomura, H. Imai, T. Kouruma, Y. Nakagawa, Involvement of mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase as an antiapoptotic factor. *Neurosignals* 10 (2001) 81–92, <https://doi.org/10.1159/000046877>.
- [33] F. Ursini, S. Heim, M. Kiess, M. Maiorino, A. Roveri, J. Wissing, L. Flohé, Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* 285 (1999) 1393–1396, 80.
- [34] J.Y. Ryu, H.U. Kim, S.Y. Lee, Human genes with a greater number of transcript variants tend to show biological features of housekeeping and essential genes. *Mol. Biosyst.* 11 (2015) 2798–2807, <https://doi.org/10.1039/c5mb00322a>.
- [35] D.L. Hatfield, M.J. Berry, V.N. Gladyshev, Selenium: its Molecular Biology and Role in Human Health, third ed., Springer Science, New York, USA, 2012.
- [36] S.C.E. Tosatto, V. Bosello, F. Fogolari, P. Mauri, A. Roveri, S. Toppo, L. Flohé, F. Ursini, M. Maiorino, The catalytic site of glutathione peroxidases. *Antioxidants Redox Signal.* 10 (2008) 1515–1525, <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2055>.
- [37] P. Scheerer, A. Borchert, N. Krauss, H. Wessner, C. Gerth, W. Höhne, H. Kuhn, Structural basis for catalytic activity and enzyme polymerization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase-4 (GPx4). *Biochemistry* 46 (2007) 9041–9049, <https://doi.org/10.1021/bi700840d>.
- [38] Y. Yu, J. Song, X. Guo, S. Wang, X. Yang, L. Chen, J. Wei, Characterization and structural analysis of human selenium-dependent glutathione peroxidase 4 mutant expressed in *Escherichia coli*. *Free Radic. Biol. Med.* 71 (2014) 332–338, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.032>.
- [39] R. Margis, C. Dunand, F.K. Teixeira, M. Margis-Pinheiro, Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *FEBS J.* 275 (2008) 3959–3970, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06542.x>.
- [40] M. Maiorino, V. Bosello-Travain, G. Cozza, G. Miotto, A. Roveri, S. Toppo, M. Zaccarin, F. Ursini, Understanding mammalian glutathione peroxidase 7 in the light of its homologs. *Free Radic. Biol. Med.* 83 (2015) 352–360, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.017>.
- [41] M. Mariotti, P.G. Ridge, Y. Zhang, A.V. Lobanov, T.H. Pringle, R. Guigo, D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev, Composition and evolution of the vertebrate and mammalian selenoproteomes. *PLoS One* 7 (2012), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033066>.
- [42] R.F. Burk, K.E. Hill, P. Selenoprotein. An extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annu. Rev. Nutr.* 25 (2005) 215–235, <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.24.012003.132120>.
- [43] P.R. Hoffmann, S.C. Höge, P.A. Li, F.W. Hoffmann, A.C. Hashimoto, M.J. Berry, The selenoproteome exhibits widely varying, tissue-specific dependence on selenoprotein P for selenium supply. *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 3963–3973, <https://doi.org/10.1093/nar/gkm355>.
- [44] J.L. Thompson, V.H.L. See, P.M. Thomas, K.A. Schuller, Cloning and characterization of two glutathione peroxidase cDNAs from southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 156 (2010) 287–297, <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.04.007>.
- [45] R.F. Burk, K.E. Hill, Regulation of selenium metabolism and transport. *Annu. Rev. Nutr.* 35 (2015) 109–134, <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071714-034250>.
- [46] M. Maiorino, M. Conrad, F. Ursini, GPx4, lipid peroxidation, and cell death: discoveries, rediscoveries, and open issues. *Antioxidants Redox Signal.* 29 (2018) 61–74, <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7115>.
- [47] S. Yin Han, M. Qiang Wang, M. Liu, B. Jie Wang, K. Yong Jiang, L. Wang, Comparative sensitivity of the hepatopancreas and midgut in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* to oxidative stress under cyclic serious/medium hypoxia. *Aquaculture* 490 (2018) 44–52, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.021>.
- [48] M. Giraud-Billoud, G.A. Rivera-Ingraham, D.C. Moreira, T. Burmester, A. Castro-Vazquez, J.M. Carvajalino-Fernández, A. Dafre, C. Niu, N. Tremblay, B. Paital, R. Rosa, J.M. Storey, I.A. Vega, W. Zhang, G. Yepiz-Plascencia, T. Zenteno-Savin, K.B. Storey, M. Hermes-Lima, Twenty years of the 'Preparation for Oxidative Stress' (POS) theory: ecophysiological advantages and molecular strategies. *Comp. Biochem. Physiol. -Part A Mol. Integr. Physiol.* 234 (2019) 36–49, <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.04.004>.
- [49] M. Hermes-Lima, D.C. Moreira, G.A. Rivera-Ingraham, M. Giraud-Billoud, T.C. Genaro-Mattos, E.G. Campos, Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: revisiting the proposal two decades later. *Free Radic. Biol. Med.* 89 (2015) 1122–1143, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.156>.
- [50] P. Hochachka, Oxygen : a Key regulatory metabolite in metabolic defense against hypoxia. *Oxford J.* 37 (1997) 595–603.
- [51] C.D. Kniffin, L.E. Burnett, K.G. Burnett, Recovery from hypoxia and hypercapnic hypoxia: impacts on the transcription of key antioxidants in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 170 (2014) 43–49, <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.01.006>.
- [52] A. Sermeus, C. Michiels, Reciprocal influence of the p53 and the hypoxic pathways. *Cell Death Dis.* 2 (2011), <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.48>.
- [53] R. González-Ruiz, A.B. Peregrino-Urriarte, E.M. Valenzuela-Soto, F.J. Cinco-Moroyoqui, M.A. Martínez-Téllez, G. Yepiz-Plascencia, Mitochondrial manganese superoxide dismutase knock-down increases oxidative stress and caspase-3 activity in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to high temperature, hypoxia, and reoxygenation. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 252 (2021) 110826, <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110826>.
- [54] W. Guan, W. Nong, X. Wei, M. Zhu, L. Mao, Impacts of a novel live shrimp (*Litopenaeus vannamei*) water-free transportation strategy on flesh quality: insights through stress response and oxidation in lipids and proteins. *Aquaculture* 533 (2021), <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736168>.
- [55] L. Lu, B.C. Oveson, Y.J. Jo, T.W. Lauer, S. Usui, K. Komeima, B. Xie, P.A. Campochiaro, Increased expression of glutathione peroxidase 4 strongly protects retina from oxidative damage. *Antioxidants Redox Signal.* 11 (2009) 715–724, <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2171>.

**3. RESPONSES AND MODULATION OF THE WHITE SHRIMP *Litopenaeus vannamei*
GLUTATHIONE PEROXIDASES 2 AND 4 DURING HYPOXIA, REOXYGENATION
AND GPX4 KNOCK-DOWN**

Paulina Estrada-Cárdenas, Alma B. Peregrino-Uriarte, Silvia Gómez-Jiménez, Elisa M.
Valenzuela-Soto, Lilia Leyva-Carrillo and Gloria Yepiz-Plascencia

Enviado a Biochimie el 07 de febrero del 2023

**Responses and modulation of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*
glutathione peroxidases 2 and 4 during hypoxia, reoxygenation and GPx4
knock-down**

Paulina Estrada-Cárdenas¹, Alma B. Peregrino-Uriarte¹, Silvia Gómez-Jiménez¹, Elisa M.
Valenzuela-Soto¹, Lilia Leyva-Carrillo¹ and Gloria Yepiz-Plascencia^{1*}

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), A.C., Carretera Gustavo Enrique
Astiazarán Rosas, No. 46, Col. La Victoria, Hermosillo, Sonora, 83304, México.

* Correspondence: gyepiz@ciad.mx

Abstract

Glutathione peroxidases (GPx) are important antioxidant enzymes that act at distinct levels of the antioxidant defense. In vertebrates, there are several GPx isoforms with different cellular and tissue distribution, but little is known about their interrelationships. The shrimp *Litopenaeus vannamei* is the main crustacean cultivated worldwide. It is affected by environmental stressors, including hypoxia and reoxygenation that cause reactive oxygen species accumulation. Thus, the antioxidant response modulation is key for shrimp resilience. Recently, several GPx isoforms genes were identified in the *L. vannamei* genome sequence, but their functions are just beginning to be studied. As in vertebrates, shrimp GPx isoforms can present differences in their antioxidant responses. Also, there could be interrelationships among the isoforms that may influence their responses. We evaluated shrimp GPx2 and GPx4 expression during hypoxia, reoxygenation, and GPx4 knock-down using RNAi for silencing, as well as the enzymatic activity of total GPx and GPx4. Also, glutathione content in hepatopancreas was evaluated. GPx2 and GPx4 presented similar expression patterns during hypoxia and reoxygenation. Their expressions decreased during hypoxia and were reestablished in reoxygenation at 6 h in non-silenced shrimp. Unexpectedly, GPx2 expression was down-regulated by GPx4 knock-down, suggesting that GPx4 affects GPx2 expression. Total GPx activity changed in hypoxia and reoxygenation at 6 h but not at 12 h, while GPx4 activity was not affected by any stressor. The GSH/GSSG ratio in hepatopancreas indicated that at early hours, the redox status remains well-modulated but at 12 h it is impaired by hypoxia and reoxygenation.

Keywords: Glutathione peroxidases; hypoxia; reoxygenation; redox status; oxidative stress; shrimp

1. Introduction

Glutathione peroxidases are enzymes with antioxidant functions that are widely distributed in all living organisms. Most glutathione peroxidase (GPx) isoforms identified are selenodependent; in mammals, at least eight GPx isoenzymes with different cellular and tissular localization have been identified and five of them are selenoproteins [1,2]. The existence of several GPx isoenzymes in vertebrates has been justified by their actions at different levels of the antioxidant defense [3,4], distinct cellular and tissular distribution [2], differences on substrate specificities [5] and, in some cases such as GPx4, some non-canonical functions [6–8]. Consistent with those differences, GPx isoforms are involved in several distinct cellular regulatory processes in different forms, and their functions are regulated in diverse pathways [9]. Among GPx isoforms, GPx4 is especially interesting due to its involvement in processes such as ferroptosis cell death [10], sperm stability and motility [7,8], cellular survival to apoptosis [6,11], and redox homeostasis [12]. However, its interrelationship with other GPx isoforms and how this affects the antioxidant response is still unclear. In mice, GPx1 knock-out (KO) did not affect GPx3 and GPx4 expression and enzymatic activity indicating that GPx1 is expressed independently of GPx3 and GPx4 [13]. Conversely, in GPx2 KO mice, total GPx enzymatic activity increased alongside GPx1 protein presence in colon and ileum, where GPx2 is typically localized, even though the GPx1 mRNA abundance did not increase, suggesting that an up-regulation may occur at the translational level [14]. Thus, it has been suggested that a molecular cross-talk between selenoproteins can occur [15].

Although in vertebrates, a molecular crosstalk between selenoproteins has been suggested, in invertebrates this aspect remains unclear. The white shrimp *Litopenaus vannamei* is an important economic penaeid shrimp and one of the most worldwide cultivated crustacean species [16]. The

first GPx identified in *L. vannamei* was reported by Liu *et al.*, (2007) with wide tissular distribution, but no identification of the specific GPx isoform was done. In the recently reported shrimp genome sequence [16], there are several GPx genes isoforms, including a GPx4 gene that produces two protein isoforms [17]. In the white shrimp, as in other organisms, the antioxidant response is crucial to cope with the oxidative stress that can damage DNA, proteins, and lipids. During its life cycle, shrimp is subjected to environmental stressors that increase reactive oxygen species (ROS) production and oxidative stress, including hypoxia (<2 mg O₂/L) and reoxygenation [18]. This has prompted studies of the responses of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and GPx to hypoxia and reoxygenation [19–21]. In gills and hepatopancreas of *L. vannamei*, SOD and GPx enzymatic activity increased during hypoxia [18]. Interestingly, in this same organism, short-term hypoxia (24 h) increased SOD enzymatic activity in muscle and hepatopancreas but not CAT and GPx activities, although during the first hour of reoxygenation the enzymatic activities decreased [20]. Another study in shrimp indicated that during hypoxia and reoxygenation, GPx gene expression did not change in gills and hepatopancreas unlike CAT and SOD that increased their expression during reoxygenation; on the contrary, GPx enzymatic activity increased in hepatopancreas during reoxygenation but not CAT and SOD activities [22]. Although these studies have evaluated some antioxidant responses against hypoxia and reoxygenation in shrimp, little is known about the specific roles of GPx isoforms and their interactions, as well as their potential mutual regulation during stress conditions. Thus, this work aimed to evaluate the gene expression changes of two *L. vannamei* GPx isoforms, GPx2 and GPx4, in response to hypoxia and reoxygenation during GPx4 knock-down, as well as total GPx and GPx4 enzymatic activity, to assess the changes and response patterns of those GPx isoforms when GPx4 expression is knock-down in shrimp. In addition, glutathione levels were analyzed to evaluate the redox state changes in these conditions.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental organisms and bioassay of hypoxia, reoxygenation and GPx4 silencing

For GPx4 silencing in shrimp, briefly, a fragment of 494 bp of *L. vannamei* GPx4 coding sequence (GenBank: OL630780.1) was amplified from a corresponding previously cloned plasmid DNA (pDNA) using the GPx4 specific primers T7GPx4AllFw/GPx4Rv6 and FwGPx4AllTv/T7GPx4Rv6 that includes the T7 promoter sequence (Table 1). The amplicons were used to produce sense and anti-sense single stranded RNA (ssRNA) with the T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System (Promega, Madison, WI, USA). To obtain double stranded RNA (dsRNA), hybridization of ssRNAs were done by mixing equal amounts of both, sense and anti-sense ssRNA; the mix was heated up to 90 °C for 3 min, 80 °C for 20 min, and cooled down slowly to room temperature for hybridization. The formation of dsRNA was verified by 2.5 % agarose gel electrophoresis.

Shrimp employed in the bioassay were obtained as post-larvae from a local laboratory in the Hermosillo, Sonora, Mexico, close to the by coast, and grown until they reached a juvenile stage in the Laboratory of Marine Invertebrates Physiology in CIAD. Shrimp were placed in 350 L tanks filled with seawater (27 ± 1 °C, 35 % salinity, 5 ± 1 mg O₂/L) with constant water recirculation and were fed with a commercial diet at 3% of their wet weight divided in three portions per day.

Previous to the hypoxia, reoxygenation, and GPx4 silencing bioassay, 300 organisms (12.44 ± 0.69 g) were redistributed in aquaria filled with 35 L of seawater (15 organisms per tank) (27 ± 1 °C, 35 % salinity, 5 ± 1 mg O₂/L). Water exchanges of 80 % volume were done every 24 h to avoid ammonia concentration above 3.0 mg/L. The experimental conditions were: Normoxia

(5.80 ± 0.36 mg O₂/L), normoxia silenced with dsRNA GPx4 (dsGPx4), hypoxia (1.09 ± 0.06 mg O₂/L), hypoxia dsGPx4, reoxygenation and reoxygenation dsGPx4 for 0, 6 and 12 h. For GPx4 knock-down, the organisms assigned to the silenced treatments were intramuscularly injected with a sterile syringe 24 h before the start of the treatment with 1.15 µg of GPx4 dsRNA per gram of weight, dissolved in 100 µL of sterile saline solution (SS) (0.9 % NaCl), while non-silenced animals were injected with SS only. The hypoxia conditions were established by bubbling nitrogen gas in the aquaria until the dissolved oxygen (DO) concentration of 1.09 ± 0.06 mg O₂/L was reached. The DO conditions were monitored every hour with a portable oximeter ProODO (YSI, Yellow Spring, OH. USA) and were adjusted by bubbling nitrogen gas as necessary. At the end of each treatment, 15 shrimp were dissected to collect hepatopancreas. A portion (~ 50 mg) of tissue was collected in a microtube with ten volumes of TRI-reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. USA) for RNA extraction, while for enzymatic activity assays and glutathione quantification, the samples were placed in an empty microtube. Once collected, the samples were immediately frozen in dry ice and stored at -80 °C until analysis.

2.2. GPx2 and GPx4 quantification of relative expression by RT-qPCR

For GPx2 and GPx4 mRNA quantification, total RNA from hepatopancreas was isolated from five organisms from each experimental treatment with TRI-reagent according to the manufacturer recommendations. The concentration, integrity and purity of total RNA were analyzed by the 260/280 nm absorbance ratio in a spectrophotometer NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific) and 1 % agarose gel electrophoresis. Residual gDNA was eliminated using DNase I (Roche, Mannheim, Germany) and two cDNAs for every shrimp were synthesized from 500 ng of each total RNA using the QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen, Valencia, CA. USA) and oligo dT.

For relative expression evaluation by RT-qPCR, specific primers for total GPx2 and total GPx4 were designed. Based on the information available in the shrimp genome, and previous reports [17], in *L. vannamei*, both, GPx2 and GPx4, have two isoforms each one. In the case of GPx2, they are produced from two distinct genes, while GPx4 has one unique gene that is transcribed to generate five transcript variants that finally produces two GPx4 isoforms [17]. Hence, specific primers were designed in conserved common regions present in all transcript variants of GPx2 and separately for GPx4 to evaluate the relative expressions. Total GPx2 and GPx4 relative expression was evaluated by RT-qPCR by duplicate for each cDNA with the specific primers GPx2AllFw/GPx2AllRv for total GPx2 expression analysis and FwGPx4AllTv and GPx4Rv2 for total GPx4 expression; the products amplified were 147 bp and 105 bp, respectively (Table 1). Gene expression of the ribosomal protein L8 was evaluated as reference gene for data normalization with the specific primers L8F2 and L8R2 that amplify a fragment of 166 bp (Table 1). All the RT-qPCR reactions were performed in a final volume of 15 μ L with the HOT FIREPol EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Estonia) using 1 μ L of cDNA (equivalent to 50 ng of total RNA) as template and primer concentration of 325 nM for total GPx2 and GPx4 reactions, while for L8 reactions, the concentration was 1000 nM. Quantitative-real time RT-qPCR analyses were performed in a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Total GPx2 running conditions were: 95 °C, 12 min (1 cycle); 95 °C, 15 s, 59 °C, 20 s, 72 °C, 30 s (40 cycles) while for total GPx4 and L8 they were the following: 95 °C, 12 min (1 cycle); 95 °C, 15 s, 58 °C, 20 s, 72 °C, 30 s (40 cycles). The specificity of the reactions was verified by running a melting curve from 65 to 95 °C with increases of 0.3 °C each 5 s, while the efficiency of the reactions was determined by running standard curves from 2.5×10^1 to 4.0×10^{-2} ng/ μ L of cDNA derived from total RNA. GPx2 and GPx4 relative expression were calculated by the $2^{-\Delta Cq}$ method [23].

2.3. Enzymatic activities of total GPx and GPx4

For total GPx and GPx4 enzymatic activities, crude extracts were prepared by homogenization of 72.70 ± 18.27 mg of hepatopancreas in 1:10 (w/v) buffer 100 mM Trizma/Base, pH 8.0, containing 1.5 mM NaN₃, 2.0 mM EDTA, 250 mM sucrose, 1 mM PMSF and 0.1 % Triton X-100 with a manual homogenizer (Kontes™ Pellet Pestle™ Cordless Motor) and centrifuged at 15,000 xg at 4°C for 15 min. The supernatant (crude extract) was collected in a microtube and frozen at -80 °C until the analyses.

Total GPx and GPx4 enzymatic activities were analyzed by a simultaneous assay recently described by Stolwijk *et al.*, (2020) [24], that permits to evaluate the enzymatic activity of total GPx and GPx4 in a single assay using phosphatidylcholine hydroperoxides (PCOOH) as specific substrate for GPx4 and H₂O₂ as a substrate for all GPxs. The PCOOH employed as GPx4 substrate was synthesized according to the method described by Stolwijk *et al.*, (2020) with the following modifications. The PCOOH synthesis was done from 5 mg of L- α -phosphatidylcholine type IV-S (PC) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA: P3644) dissolved in 0.518 mL of chloroform. PC was added slowly at a rate of 1 drop per 2 s to 2 mL of buffer solution (0.2 M Trizma/Base, pH 8.8, 3 mM sodium deoxycholate) with constant stirring at medium to high speed. After PC addition a cloudy emulsion was formed and then, 18 mL more of buffer solution was added at a rate of 1 mL per 10 s and the stirring speed was changed to medium-low; mixing continued until the solution became clear. The synthesis of PCOOH was initiated with the addition of 25,000 U of soybean lipoxidase type-V (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA: L6632) to the PC solution. The PC hydroperoxidation reaction was done at room temperature for 1 h with constant agitation at medium to low speed to maintain air saturation. The synthesized PCOOH was purified from the buffer components using a Sep-Pak C18 cartridge (Waters

Corporation, Milford, MA. USA). Before PCOOH purification, the C18 cartridge was activated and equilibrated with 6 and 10 volumes of methanol and milli-Q water, respectively; then the PCOOH mixture was loaded into the C18 column and slowly passed through the cartridge at a rate of a drop per second. Since PCOOH remains retained in the cartridge, 10 Milli-Q water volumes were passed through to expel the aqueous components of the buffer. To elute the PCOOH retained in the cartridge 1.5 mL of methanol was used. Three syntheses were required to obtain the total substrate volume needed for all assays of enzymatic activity; the batches were synthesized and mixed for storage at -20 °C. The PCOOH concentration was evaluated spectrophotometrically at 234 nm before each experiment using methanol as blank and the extinction molar coefficient $\epsilon_{234 \text{ nm}} = 25,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and adjusted to 2 mM with methanol for the assays.

The simultaneous assay for the total GPx and GPx4 enzymatic activity evaluation was performed following the method described by Stolwijk *et al.*, (2020) in which NADPH oxidation, that in a coupled reaction with the glutathione reductase (GR) is equivalent to GPx enzymatic activity, is monitored at 340 nm after substrate addition [24]. The reactions were done in a microplate at a final volume of 250 μL , adding to the wells 12.5 μL of crude extract as sample and 12.5 μL of 4 mM NADPH, 12.5 μL GR 30 U mL^{-1} , 12.5 μL of 60 mM GSH, and 192.5 μL of assay buffer (100 mM Trizma/Base, pH 8.0, 1.5 mM NaN_3 , 2.0 mM EDTA, 0.1 % Triton X-100) in the mentioned order. The reaction components were incubated for 5 min at 37 °C for their full reduction. After incubation, kinetic measurement of the background was performed monitoring the absorbance at 340 nm each 10 s during 100 s. Since GPx4, unlike other GPxs uses lipid hydroperoxides as substrate and is expected that its activity is lower than the total GPx activity, to initiate the reactions 3.75 μL of 2 mM PCOOH were added as GPx4 substrate, and

immediately, the GPx4 dependent NADPH oxidation was monitored for 100 s with readings each 10 s. Finally, at about 200 s, 3.75 μ L of 17 mM H₂O₂ was added to measure the total GPx NADPH-dependent oxidation for 100 s. The background, PCOOH, and H₂O₂ slopes were determined (slopes 1, 2, and 3, respectively) for GPx4 and total GPx enzymatic activity calculations. The GPx4 dependent rate was obtained by subtracting from the value of slope 2 the value of slope 1, while the total GPx dependent rate was obtained from the subtraction of the slope 2 value from the slope 3 value. GPx4 and total GPx rates values were used for the enzymatic activity calculation using the NADPH molar extinction coefficient. The protein content was evaluated in the samples by the bicinchoninic acid method (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific), using bovine serum albumin for the standard curve to express the enzymatic activities of GPx4 and total GPx as activity in milliunits/mg of protein.

2.4. Glutathione quantification

The content of reduced glutathione (GSH) and its disulfide (GSSG) were evaluated in hepatopancreas crude extracts (n=4) with the Sigma-Aldrich kit 38185, following the manufacturer recommendations. Briefly, total glutathione (Gt) and GSSG were determined in samples by the reaction with DTNB (5,5' -dithiobis (2-nitrobenzoic acid)) that forms TNB (5' -thio-2-nitrobenzoic acid), a yellow derivate, by GSH oxidation. For GSSG quantification, a masking reagent was used to remove GSH. Each quantification was done by duplicate and the absorbance was recorded at 415 nm in a Multiskan Sky microplate reader (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The GSH content in the samples was calculated from Gt and GSSG values.

2.5. Statistical analysis

Data were analyzed for normality and homoscedasticity. Data sets that met the assumptions of normality and equality of variance were analyzed by one-way ANOVA and Tukey-Kramer *post hoc* test to determine the effect of hypoxia and reoxygenation in total GPx2 and GPx4 expression, as well as in total GPx and GPx4 enzymatic activity and GSH, GSSG, Gt content, and GSH/GSSG ratio, while non-parametric analyses of Kruskal-Wallis test with Dunn's *post hoc* test were performed in those that did not meet the normality and homoscedasticity assumptions. To assess the GPx4 silencing efficiencies, T-student tests were done to compare silenced groups with their respective non-silenced controls. All tests were performed in the NCSS (2011) software with a level of significance of $p \leq 0.05$. Data were plotted in the software GraphPad Prism version 5 as mean \pm standard error of the mean (SEM).

3. Results and discussion

3.1. GPx4 knock-down in shrimp hepatopancreas

Total GPx4 expression was evaluated in silenced and non-silenced shrimp to determine GPx4 silencing efficiencies. The silencing of GPx4 was effective, since in GPx4 knock-down shrimp GPx4 the expression was significantly reduced at 6 and 12 h (Table 2) ($p < 0.05$). GPx4 expression decreased 81.43% at 12 h in silenced shrimp ($p < 0.05$), while at 0 h decreased 23.90% ($p > 0.05$). During normoxia and hypoxia, GPx4 silencing efficiencies increased across time, until reaching the maximum with 81.43% and 66.51% at 12 h, respectively, while in reoxygenation, the maximum was obtained at 6 h, but subsequently decreased at 12 h from 62.03% to 53.84%. Similarly, during p53 knock-down in *P. monodon*, at 0 h post-injection with p53 dsRNA, p53 expression did not decrease, but from 12 to 72 h, it was reduced 88.67%, and after

96 h, was only 20% less than in the un-silenced animal [25]. Also, in *L. vannamei* hepatopancreas, p53 silencing reduced p53 expression 77.9 % at 24 h and 90.6 % at 48 h [26].

Other studies that performed GPx4 silencing, reported efficiencies of 50 % in vertebrates derived MEL cells [27], ~ 50 – 60 % in Caco-2 cells [28], and 32 % in Huh7.5 cells [29]. Although GPx4 silencing efficiencies herein obtained in *L. vannamei* hepatopancreas were similar, ranging from 23.90 % to 81.43 %, there are several aspects that influence silencing, including cell-specific factors and molecular aspects of the individual interference RNA (iRNA) method used [30]. Therefore, the silencing efficiencies are variable and different efficiencies can be obtained depending on the organisms, target gene, experimental conditions [30], handling of the organisms [31], and time, just to mention a few.

3.2. Total GPx2 and GPx4 gene expression during hypoxia and reoxygenation in GPx4 knock-down shrimp

In hepatopancreas, total GPx2 expression was higher compared to total GPx4 expression ($p < 0.05$), suggesting that in this tissue, GPx2 could exert a major antioxidant response in comparison to GPx4 (Figure 1). Although, initially GPx2 was found in the gastrointestinal tract and thus named gastrointestinal glutathione peroxidase (GI-GPx) in mammals, it has also been found in other tissues [5]. In the white shrimp, Liu *et al.*, (2007) characterized a GPx selenodependent with wide tissue distribution [32], that now, consistent with the shrimp genome data, matches with a GPx2 isoform, and according to our findings, has high expression in shrimp hepatopancreas (Figure 1B) ($p < 0.05$). Although the main function of GPxs is the reduction of hydroperoxides, the isoforms have different substrate specificities and are also involved in distinct biological roles [33], thus, it could be expected that they have different tissue specific expression levels as was found in *L. vannamei* hepatopancreas.

On the other hand, in *L. vannamei* hepatopancreas, total GPx2 and total GPx4 were very responsive to hypoxia, reoxygenation and GPx4 knock-down from early hours. Total GPx4 expression changed from the 6 h in response to changes in the DO, and GPx4 knock-down ($p < 0.05$) (Figure 1A). During hypoxia, GPx4 expression decreased at 6 h in non-silenced shrimp with a 2.44-fold change compared to the normoxic control and recovered during reoxygenation ($p < 0.05$) (Figure 1A). This agrees with a previous report in *L. vannamei* GPx4 expression in hepatopancreas, in which GPx4 expression decreased at 6 h of hypoxia exposure [17].

Interestingly, total GPx2 expression patterns were similar to those of total GPx4 at 6 h, since in non-silenced shrimp, total GPx2 expression decreased during hypoxia with 2.03-fold change and increased after reoxygenation up to 1.88-fold compared to its 6 h normoxic control ($p < 0.05$) (Figure 1B). In the shrimp *P. monodon*, GPx1 and GPx7 have different expression patterns in gills and hepatopancreas under saline challenge, metals exposure, and pathogen infection with *Vibrio harveyi* and *Streptococcus agalactiae* [34]. Similarly, in the marine teleost *Sparus aurata*, GPx1 and GPx4 expressions varied during confinement and fasting stress [35]. Although there are differences in the GPxs expression patterns, cellular and tissular distribution, and substrate utilization [2], some of their responses might converge under specific stressors to counteract oxidative stress as seems to occur in the white shrimp hepatopancreas during hypoxia and reoxygenation, where the GPx2 and GPx4 responses converge decreasing their expression during hypoxia at 6 h, probably due to the use of energy for maintenance of other functions necessary to overcome the stress [35,36], and to recover during reoxygenation. Moreover, GPx2 and GPx4 gene expression in *L. vannamei* might go under similar regulation during changes in the DO concentration, mediated by oxygen responsive elements. During stress, transcription factors such as HIF-1, p53, AP-1, c-Jun, and NF-kappa B are regulated in response to ROS, inducing changes in the expression of several genes [37,38]. In vertebrates, some antioxidant genes, including the

GPx genes, are regulated by HIF-1 [39,40] and p53 [41–44]. Also, current evidence suggests that similarly, antioxidant responses in crustaceans could be mediated by HIF-1 [45] and p53 [17,25,46] during stress.

In addition, unexpectedly, total GPx2 expression was reduced by GPx4 knock-down in shrimp hepatopancreas (Figure 1B). During the reduction or elimination of one of the elements of the antioxidant response, oxidative imbalance might be promoted and therefore, the development of compensatory mechanisms could be expected to avoid oxidative damage. In mice, GPx2 KO was compensated by GPx1 up-regulation at the post-translational level in crypts where GPx2 is preferentially expressed [14]. However, in *L. vannamei* hepatopancreas, the opposite occurs and GPx2 expression was reduced during GPx4 knock-down. These responses depend on the cellular context, implicated genes, and complex molecular cross-talk, since GPxs as antioxidant enzymes reduce ROS levels and can impact signal transduction pathways and ROS responsive elements present in several antioxidant genes [15], therefore, different molecular cross-talk can occur depending of the biological perturbations that the organisms face. In agreement, some reports point to different interrelationships among selenoproteins. In Caco-2 cells, GPx1 knock-down did not affect GPx2 and GPx4 expression keeping their ability to compensate GPx1 low expression [47], while in mice, Sel P deletion decreased GPx1, GPx4, and Sel W expression in different tissues [48].

On the other hand, at 12 h total GPx2 and GPx4 expression did not have statistically significant changes in response to hypoxia and reoxygenation, due to the high biological variability in shrimp. However, total GPx2 and total GPx4, unlike at 6 h responses, presented tendencies with differences in their expression patterns; since total GPx4 expression appeared to increase with 1.87-fold change during reoxygenation compared to normoxia treatment in non-silenced shrimp

($p > 0.05$), while in silenced shrimp, the increase was significant ($p < 0.05$). In contrast, total GPx2 expression at 12 h did not present statistically significant changes neither in silenced, nor in non-silenced shrimp, despite during reoxygenation total GPx2 expression was 1.57-fold lower compared to the 12 h normoxia control in non-silenced shrimp ($p > 0.05$).

3.3. Enzymatic activity of total GPx and GPx4, glutathione content and redox status during hypoxia and reoxygenation in hepatopancreas of GPx4 knock-down shrimp.

To get insight about how the GPxs antioxidant enzymatic response is affected during hypoxia, reoxygenation, and GPx4 knock-down, we evaluated total GPx and specific GPx4 enzymatic activities using a specific substrate for GPx4 and a common substrate for all GPxs. As we expected, the total GPx enzymatic activity was several times higher than GPx4 activity in shrimp hepatopancreas (Figure 2). Also, the changes in enzymatic activities of total GPx and GPx4 in response to hypoxia and reoxygenation were different at the distinct tested times, while the activities of total GPx and GPx4, were not affected by GPx4 knock-down, indicating that the antioxidant response can be maintained even when GPx4 transcripts presence is reduced (Figure 2). In agreement with this result, the redox status, evaluated by the GSH/GSSG ratio, was not affected by GPx4 silencing neither (Table 3), indicating that GPx4 knock-down does not induce a major oxidative stress in shrimp hepatopancreas. GPx4 is the only one GPx from this family that can reduce lipid hydroperoxides directly from membranes and their dysfunction or elimination has been associated with multiple dysfunctions and cellular death in vertebrates [49,50]. However, surprisingly in shrimp hepatopancreas, GPx4 knock-down did not alter glutathione redox status significantly in any of the evaluated times (Table 3), indicating that the antioxidant response is well modulated in this tissue, probably because the GPx4 enzymatic activity is not totally impaired by GPx4 knock-down neither, even though the GPx4 silencing efficiencies

obtained ranged from 23.90 % to 81.43 %. It is worth to remember that silencing using RNAi degrades the target transcript, but the decrease in protein concentration due to silencing may take time, since transcription and translation rates are not exactly coupled, each is differently regulated by their own pathways and also, the impact of distinct effectors can vary. Moreover, the effect over the amount of the protein already present before the silencing may take some time to occur and be reflected in enzyme activity [51]. It is also possible that other antioxidant elements could be contributing to oxidative stress modulation as well.

On the other hand, hypoxia and reoxygenation induced significant changes in total GPx enzymatic activity at 6 h, but not in GPx4 (Figure 2). During hypoxia, non-silenced shrimp presented a reduction tendency in total GPx enzymatic activity with a 1.97-fold less in enzymatic activity ($p = 0.06$) and a reestablishment of the enzymatic activity during reoxygenation ($p < 0.05$) (Figure 2A). In another study done in *L. vannamei*, Parrilla-Taylor and Zenteno-Savín (2011) found that GPx enzymatic activity in hepatopancreas is not altered at 24 h by hypoxia and reoxygenation, but in gills, it increased significantly due to reoxygenation [52]. Similarly, in this same organism, the GPx enzymatic activity in hepatopancreas did not change after 24 h of hypoxia exposure but it was higher after reoxygenation [22]. These reports agree with our findings at 6 h, which indicates that during hypoxia and reoxygenation, changes in total GPx enzymatic activity responses occur from early hours of stress exposure. However, at 12 h, total GPx activity did not change in response to hypoxia and reoxygenation neither in silenced nor in non-silenced shrimp, therefore it is probable that against changes in the oxygen supply, *L. vannamei* goes through distinct adaptation phases across time that involves changes in the biological responses such as enzymatic activity adjustments, as occurs against other stressors. During cyclic serious medium hypoxia, *L. vannamei* GPx expression in hepatopancreas is down-

regulated after 1 d of exposure, reestablishing on the third day, but during day 14 and 28, it was down-regulated again [53].

Interestingly, unlike total GPx enzymatic activity, GPx4 activity was unaffected by hypoxia or reoxygenation, since in both, silenced and non-silenced shrimp, no changes in GPx4 enzymatic activity were found in any of the evaluated times (Figure 2B). During hypoxia the synthesis of several selenoproteins and their activities can be impaired due to the down-regulation of some enzymes needed for selenium recycling, activation, and generation of the Sec-loaded tRNA. Nevertheless, selenoprotein biosynthesis reduction led by post-translational mechanisms during hypoxia seems to be specific for some selenoproteins, since under hypoxia, hepatocytes cells maintain GPx4 gene expression and enzymatic activity, while other selenoproteins as GPx1, selenoprotein P and deiodinases type 1, decline in their protein concentration and enzymatic activity during low oxygen supply in human hepatoma HepG2 cells [54]. GPx4 is the main enzyme that reduces membrane lipid hydroperoxides directly, thus it is considered essential for cell protection [50]. Therefore, it is likely that as in selenium deprivation, where GPx4 and GPx2 biosynthesis is prioritized above others as GPx1 and GPx3 [55]; during hypoxia GPx4 function is favored over other GPxs due to its biological relevance.

On the other hand, despite the early changes presented in the total GPx enzymatic activity, in shrimp hepatopancreas, GSH and GSSG content was maintained without statistically significant changes in silenced and non-silenced shrimp during hypoxia and reoxygenation at 6 and 12 h, due to the high shrimp biological variability; however, variations in their concentrations were reflected in the changes at 6 h in total glutathione content ($p < 0.05$) (Table 3). Glutathione is the main low molecular weight antioxidant in cells, since its antioxidant functions are exerted at different levels of the antioxidant defense, thus, during stress, changes in the glutathione content

can be expected [56]; however in *L. vannamei* hepatopancreas, the changes in GSH, GSSG and total glutathione concentrations during hypoxia and reoxygenation were subtle (Table 3). Similarly, the redox status in hepatopancreas was not affected by hypoxia and reoxygenation at 6 h but at 12 h it decreased in non-silenced shrimp ($p < 0.05$). Although in shrimp hepatopancreas, the antioxidant response seems to be well modulated during hypoxia and reoxygenation in early hours, at which changes in GPx2 and GPx4 expression occur as well as in the enzymatic activity of total GPx, it is likely that under prolonged stress, the antioxidant response is overcome, since during hypoxia and reoxygenation in the white shrimp, a high ROS production is triggered [57], which can result in oxidative damage, carbonylated proteins increase [58], and changes in redox status. Interestingly, in a previous report, we found that in *L. vannamei* after 24 h of hypoxia and reoxygenation exposure, the redox status was not altered [22]. This might suggest that the redox imbalance detected at 12 h could be transitory in shrimp hepatopancreas. In the brown garden snail *Helix aspersa*, the redox status is not perturbed by anoxia and reoxygenation [59]. Also, in the crab *Neohelice granulata*, the redox status, evaluated by the GSH/GSSG ratio, is not affected in muscle by hypoxia but it is by reoxygenation [60]. Responses of those organisms to similar stressors to the ones we evaluated differ from our findings in the white shrimp hepatopancreas, which could be related to the hypoxia tolerance of the organisms and their adaptation strategies, since during stress, changes in the redox status can be promoted by several mechanisms and variations of the rate of glutathione synthesis, recycling, metabolism and glutathionylation of proteins [61]. However, according to our findings, the white shrimp appears to be a quite resilient organism able to endure different abiotic stressors, including hypoxia and reoxygenation, by modulation of the antioxidant response [22,53,62,63], in which, GPx2 and GPx4 play an important role as essential selenoproteins involved in the antioxidant responses.

4. Conclusions

Hypoxia and reoxygenation are common stressors for the white shrimp that impair the redox status by modulation of the glutathione content. GPx2 and GPx4 were responsive at early hours promoting the adaptation to changes in oxygen supply through changes in their gene expression patterns and enzymatic activity. Surprisingly, gene expression regulation of GPx2 and GPx4 in the shrimp suggests an interrelationship that remains unclear, in which GPx2 expression is down-regulated during GPx4 knock-down. Thus, further studies that address this issue are needed.

Author Contributions

The GPx4 silencing and hypoxia-reoxygenation bioassay was designed and performed by PEC as well as the experiments, data analysis and writing of the original draft. ABPU and LLC collaborated in the bioassay, supervised the experiments and contributed with important suggestions during the study. EMVS gave very useful suggestions during the experiments and contributed to the enzymatic activity data analysis. SGJ supervised and made important suggestions for the GPx4 silencing bioassay, also provided the facilities for the shrimp bioassay. GYP designed, directed, and supervised the experiments. All the authors critically revised and edited the manuscript.

Funding

This research was funded by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México), grant PN2017/4869.

Acknowledgments

We thank Luis Adrián Gámez Alejo and Julio César Apodaca from the Laboratory of Marine Invertebrates Physiology (CIAD) for the help with the shrimp bioassay.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] R. Brigelius-Flohé, M. Maiorino, Glutathione peroxidases, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830 (2013) 3289–3303. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>.
- [2] R. Margis, C. Dunand, F.K. Teixeira, M. Margis-Pinheiro, Glutathione peroxidase family - An evolutionary overview, *FEBS J.* 275 (2008) 3959–3970. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06542.x>.
- [3] A.W. Girotti, Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems, *J. Lipid Res.* 39 (1998) 1529–1542.
- [4] E. V. Pradedova, O.D. Isheeva, R.K. Salyaev, Classification of the antioxidant defense system as the ground for reasonable organization of experimental studies of the oxidative stress in plants, *Russ. J. Plant Physiol.* 58 (2011) 210–217. <https://doi.org/10.1134/S1021443711020166>.
- [5] R. Brigelius-Flohé, A.P. Kipp, Physiological functions of GPx2 and its role in inflammation-triggered carcinogenesis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1259 (2012) 19–25. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06574.x>.
- [6] K. Nomura, H. Imai, T. Koumura, Y. Nakagawa, Involvement of mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase as an antiapoptotic factor,

- NeuroSignals. 10 (2001) 81–92. <https://doi.org/10.1159/000046877>.
- [7] R. Puglisi, F. Tramer, G. Carlomagno, L. Gandini, E. Panfili, M. Stefanini, A. Lenzi, F. Mangia, C. Boitani, PHGPx in spermatogenesis: How many functions?, *Contraception*. 72 (2005) 291–293. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2005.03.002>.
- [8] F. Ursini, S. Heim, M. Kiess, M. Maiorino, A. Roveri, J. Wissing, L. Flohé, Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation, *Science* (80-.). 285 (1999) 1393–1396. <https://doi.org/10.1126/science.285.5432.1393>.
- [9] R. Brigelius-Flohé, L. Flohé, Regulatory Phenomena in the Glutathione Peroxidase Superfamily, *Antioxidants Redox Signal*. 33 (2019) 498–516. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7905>.
- [10] M. Maiorino, M. Conrad, F. Ursini, GPx4, Lipid Peroxidation, and Cell Death: Discoveries, Rediscoveries, and Open Issues, *Antioxidants Redox Signal*. 29 (2018) 61–74. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7115>.
- [11] K. Nomura, H. Imai, T. Koumura, T. Kobayashi, Y. Nakagawa, Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis, *Biochem. J.* 351 (2000) 183–193.
- [12] H. Imai, Y. Nakagawa, Biological significance of phospholipid hydroperoxidase glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells, *Free Radic. Biol. Med.* 34 (2003) 145–169.
- [13] W.H. Cheng, Y.S. Ho, D.A. Ross, B.A. Valentine, G.F. Combs, X.G. Lei, Cellular glutathione peroxidase knockout mice express normal levels of selenium-dependent

- plasma and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases in various tissues, *J. Nutr.* 127 (1997) 1445–1450. <https://doi.org/10.1093/jn/127.8.1445>.
- [14] S. Florian, S. Krehl, M. Loewinger, A. Kipp, A. Banning, S. Esworthy, F.F. Chu, R. Brigelius-Flohé, Loss of GPx2 increases apoptosis, mitosis, and GPx1 expression in the intestine of mice, *Free Radic. Biol. Med.* 49 (2010) 1694–1702. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.029>.
- [15] E. Ansong, W. Yang, A.M. Diamond, Molecular cross-talk between members of distinct families of selenium containing proteins, *Mol. Nutr. Food Res.* 58 (2014) 117–123. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300543>.
- [16] X. Zhang, J. Yuan, Y. Sun, S. Li, Y. Gao, Y. Yu, C. Liu, Q. Wang, X. Lv, X. Zhang, K.Y. Ma, X. Wang, W. Lin, L. Wang, X. Zhu, C. Zhang, J. Zhang, S. Jin, K. Yu, J. Kong, P. Xu, J. Chen, H. Zhang, P. Sorgeloos, A. Sagi, A. Alcivar-Warren, Z. Liu, L. Wang, J. Ruan, K.H. Chu, B. Liu, F. Li, J. Xiang, Penaeid shrimp genome provides insights into benthic adaptation and frequent molting, *Nat. Commun.* 10 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08197-4>.
- [17] P. Estrada-Cárdenas, A.B. Peregrino-Uriarte, L. Camacho-Jiménez, J. Hernandez-López, C.A. Contreras-Vergara, G. Yepiz-Plascencia, p53 knock-down and hypoxia affects glutathione peroxidase 4 antioxidant response in hepatopancreas of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*, *Biochimie.* 199 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.03.010>.
- [18] Y. Li, L. Wei, J. Cao, L. Qiu, X. Jiang, P. Li, Q. Song, H. Zhou, Q. Han, X. Diao, Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme activities in the pacific white

- shrimp (*Litopenaeus vannamei*) when exposed to hypoxia and reoxygenation, *Chemosphere*. 144 (2016) 234–240. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.051>.
- [19] R. González-Ruiz, A.B. Peregrino-Uriarte, E.M. Valenzuela-Soto, F.J. Cinco-Moroyoqui, M.A. Martínez-Téllez, G. Yepiz-Plascencia, Mitochondrial manganese superoxide dismutase knock-down increases oxidative stress and caspase-3 activity in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to high temperature, hypoxia, and reoxygenation, *Comp. Biochem. Physiol. -Part A Mol. Integr. Physiol.* 252 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110826>.
- [20] D.P. Parrilla-Taylor, T. Zenteno-Savín, Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation, *Aquaculture*. 318 (2011) 379–383. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.05.015>.
- [21] C.H. Trasviña-Arenas, A. Garcia-Triana, A.B. Peregrino-Uriarte, G. Yepiz-Plascencia, White shrimp *Litopenaeus vannamei* catalase: gene structure, expression and activity under hypoxia and reoxygenation., *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 164 (2013) 44–52.
- [22] P. Estrada-Cárdenas, D.G. Cruz-Moreno, R. González-Ruiz, A.B. Peregrino-Uriarte, L. Leyva-Carrillo, L. Camacho-Jiménez, I. Quintero-Reyes, G. Yepiz-Plascencia, Combined hypoxia and high temperature affect differentially the response of antioxidant enzymes, glutathione and hydrogen peroxide in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*, *Comp. Biochem. Physiol. -Part A Mol. Integr. Physiol.* 254 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.110909>.
- [23] T.D. Schmittgen, K.J. Livak, Analyzing real-time PCR data by the comparative CT

- method, *Nat. Protoc.* 3 (2008) 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.
- [24] J.M. Stolwijk, K.C. Falls-Hubert, C.C. Searby, B.A. Wagner, G.R. Buettner, Simultaneous detection of the enzyme activities of GPx1 and GPx4 guide optimization of selenium in cell biological experiments, *Redox Biol.* 32 (2020) 101518. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101518>.
- [25] F. Li, P. Wang, C. Zhao, W. Bao, L. Qiu, Cloning and characterization of PHGPx and its synergistic role with p53 in mediating stress in *Penaeus monodon*, *Fish Shellfish Immunol.* 71 (2017) 380–392. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.10.018>.
- [26] D. Nuñez-Hernandez, L. Camacho-Jiménez, L. Leyva-Carrillo, A.B. Peregrino-Uriarte, E.M. Valenzuela-Soto, S. Gómez-Jiménez, H. González-Ríos, G. Yepiz-Plascencia, Expression of p53 isoforms in response to two levels of hypoxia and effects of p53 knock-down in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*, *Aquac. Res.* (2021) 1–11. <https://doi.org/10.1111/are.15083>.
- [27] M. Rademacher, H. Kuhn, A. Borchert, Expression silencing of glutathione peroxidase 4 in mouse erythroleukemia cells delays in vitro erythropoiesis, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms22157795>.
- [28] P. Cole-Ezea, D. Swan, D. Shanley, J. Hesketh, Glutathione peroxidase 4 has a major role in protecting mitochondria from oxidative damage and maintaining oxidative phosphorylation complexes in gut epithelial cells, *Free Radic. Biol. Med.* 53 (2012) 488–497. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.029>.
- [29] C. Brault, P. Lévy, S. Duponchel, M. Michelet, A. Sallé, E.I. Pécheur, M.L. Plissonnier, R. Parent, E. Véricel, A. V. Ivanov, M. Demir, H.M. Steffen, M. Odenthal, F. Zoulim, B.

Bartosch, Glutathione peroxidase 4 is reversibly induced by HCV to control lipid peroxidation and to increase virion infectivity, *Br. Med. J.* 65 (2016) 144–154.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307904>.

[30] P. Pancoska, Z. Moravek, U.M. Moll, Efficient RNA interference depends on global context of the target sequence: Quantitative analysis of silencing efficiency using Eulerian graph representation of siRNA, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 1469–1479.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh314>.

[31] A. García-Triana, S. Gómez-Jiménez, A.B. Peregrino-Uriarte, A. López-Zavala, G. González-Aguilar, R.R. Sotelo-Mundo, E.M. Valenzuela-Soto, G. Yepiz-Plascencia, Expression and silencing of Selenoprotein M (SelM) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Effect on peroxidase activity and hydrogen peroxide concentration in gills and hepatopancreas, *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 155 (2010) 200–204.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.10.037>.

[32] C.H. Liu, M.C. Tseng, W. Cheng, Identification and cloning of the antioxidant enzyme, glutathione peroxidase, of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and its expression following *Vibrio alginolyticus* infection, *Fish Shellfish Immunol.* 23 (2007) 34–45.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.09.002>.

[33] L. Flohé, S. Toppo, L. Orian, The glutathione peroxidase family: Discoveries and mechanism, *Free Radic. Biol. Med.* 187 (2022) 113–122.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.05.003>.

[34] W. Liu, C. Zhao, P. Wang, S. Wang, H. Lin, L. Qiu, The response of glutathione peroxidase 1 and glutathione peroxidase 7 under different oxidative stresses in black tiger

- shrimp, *Penaeus monodon*, *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* 217 (2018) 1–13.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2017.12.009>.
- [35] E.E. Malandrakis, A. Exadactylos, O. Dadali, E. Golomazou, S. Klaoudatos, P. Panagiotaki, Molecular cloning of four glutathione peroxidase (GPx) homologs and expression analysis during stress exposure of the marine teleost *Sparus aurata*, *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 168 (2014) 53–61.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.11.005>.
- [36] P. Hochachka, Oxygen : A Key regulatory metabolite in metabolic defense against hypoxia, *Oxford Journals.* 37 (1997) 595–603.
- [37] Y. Sun, L.W. Oberley, Redox regulation of transcriptional activators, *Free Radic. Biol. Med.* 21 (1996) 335–348. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(96\)00109-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(96)00109-8).
- [38] G.L. Semenza, Hypoxia-inducible factor 1 and the molecular physiology of oxygen homeostasis, *J. Lab. Clin. Med.* 131 (1998) 207–214. [https://doi.org/10.1016/S0022-2143\(98\)90091-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2143(98)90091-9).
- [39] V. Bosello-Travain, H.J. Forman, A. Roveri, S. Toppo, F. Ursini, R. Venerando, C. Warnecke, M. Zaccarin, M. Maiorino, Glutathione peroxidase 8 is transcriptionally regulated by HIF α and modulates growth factor signaling in HeLa cells, Elsevier, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.12.020>.
- [40] C. Bierl, B. Voetsch, R.C. Jin, D.E. Handy, J. Loscalzo, Determinants of human plasma glutathione peroxidase (GPx-3) expression, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 26839–26845.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M401907200>.
- [41] M. Tan, S. Li, M. Swaroop, K. Guan, L.W. Oberley, Y. Sun, Transcriptional activation of

- the human glutathione peroxidase promoter by p53, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 12061–12066. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.17.12061>.
- [42] W. Yan, X. Chen, GPX2, a direct target of p63, inhibits oxidative stress-induced apoptosis in a p53-dependent manner, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 7856–7862. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512655200>.
- [43] W.J. Mai, J.L. Yan, L. Wang, Y. Zheng, Y. Xin, W.N. Wang, Acute acidic exposure induces p53-mediated oxidative stress and DNA damage in tilapia (*Oreochromis niloticus*) blood cells, *Aquat. Toxicol.* 100 (2010) 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.07.025>.
- [44] A.A. Sablina, A. V. Budanov, G. V. Ilyinskaya, L.S. Agapova, J.E. Kravchenko, P.M. Chumakov, The antioxidant function of the p53 tumor suppressor, *Nat. Med.* 11 (2005) 1306–1313. <https://doi.org/10.1038/nm1320>.
- [45] M. Felix-Portillo, J.A. Martinez-Quintana, A.B. Peregrino-Uriarte, G. Yepiz-Plascencia, The metallothionein gene from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Characterization and expression in response to hypoxia, *Mar. Environ. Res.* 101 (2014) 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.09.005>.
- [46] Z. Qian, T. Liu, Q. Liu, S. He, Y. Liu, F. Hou, X. Wang, X. Mi, C. Cai, X. Liu, P53 is involved in shrimp survival via its regulation roles on MnSOD and GPx in response to acute environmental stresses, *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 159 (2014) 38–51. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.09.009>.
- [47] G. Gong, C. Méplan, H. Gautrey, J. Hall, J.E. Hesketh, Differential effects of selenium and knock-down of glutathione peroxidases on TNF α and flagellin inflammatory responses in

- gut epithelial cells, *Genes Nutr.* 7 (2012) 167–178. <https://doi.org/10.1007/s12263-011-0256-4>.
- [48] P.R. Hoffmann, S.C. Höge, P.A. Li, F.W. Hoffmann, A.C. Hashimoto, M.J. Berry, The selenoproteome exhibits widely varying, tissue-specific dependence on selenoprotein P for selenium supply, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 3963–3973. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm355>.
- [49] M. Conrad, M. Schneider, A. Seiler, G.W. Bornkamm, Physiological role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mammals, *Biol. Chem.* 388 (2007) 1019–1025. <https://doi.org/10.1515/BC.2007.130>.
- [50] H. Imai, Y. Nakagawa, Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells, *Free Radic. Biol. Med.* 34 (2003) 145–169.
- [51] J. Hausser, A. Mayo, L. Keren, U. Alon, Central dogma rates and the trade-off between precision and economy in gene expression, *Nat. Commun.* 10 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07391-8>.
- [52] D.P. Parrilla-Taylor, T. Zenteno-Savín, Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation, *Aquaculture.* 318 (2011) 379–383. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.05.015>.
- [53] S. Han, M. Wang, M. Liu, B. Wang, K. Jiang, L. Wang, Comparative sensitivity of the hepatopancreas and midgut in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* to oxidative stress under cyclic serious/medium hypoxia, *Aquaculture.* 490 (2018) 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.021>.

- [54] N.P. Becker, J. Martitz, K. Renko, M. Stoedter, S. Hybsier, T. Cramer, L. Schomburg, Hypoxia reduces and redirects selenoprotein biosynthesis, *Metallomics*. 6 (2014) 1079–1086. <https://doi.org/10.1039/c4mt00004h>.
- [55] L. Schomburg, U. Schweizer, Hierarchical regulation of selenoprotein expression and sex-specific effects of selenium, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1790 (2009) 1453–1462. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.03.015>.
- [56] R. Masella, R. Di Benedetto, R. Vari, C. Filesi, C. Giovannini, Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes, *J. Nutr. Biochem.* 16 (2005) 577–586. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.05.013>.
- [57] T. Zenteno-Savín, R. Saldierna, M. Ahuejote-Sandoval, Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp, *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 142 (2006) 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.11.001>.
- [58] R. González-Ruiz, A.B. Peregrino-Uriarte, E.M. Valenzuela-Soto, F.J. Cinco-Moroyoqui, M.A. Martínez-Téllez, G. Yepiz-Plascencia, Mitochondrial manganese superoxide dismutase knock-down increases oxidative stress and caspase-3 activity in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to high temperature, hypoxia, and reoxygenation, *Comp. Biochem. Physiol. -Part A Mol. Integr. Physiol.* 252 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110826>.
- [59] A.F. Welker, D.C. Moreira, M. Hermes-Lima, Roles of catalase and glutathione peroxidase in the tolerance of a pulmonate gastropod to anoxia and reoxygenation, *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 186 (2016) 553–568.

<https://doi.org/10.1007/s00360-016-0982-4>.

- [60] M.A. Geihs, M.A. Vargas, F.E. Maciel, O. Vakkuri, V.B. Meyer-Rochow, S. Allodi, L.E.M. Nery, Effects of hypoxia and reoxygenation on the antioxidant defense system of the locomotor muscle of the crab *Neohelice granulata* (Decapoda, Varunidae), *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 186 (2016) 569–579.

<https://doi.org/10.1007/s00360-016-0976-2>.

- [61] H.J. Forman, Glutathione - From antioxidant to post-translational modifier, *Arch. Biochem. Biophys.* 595 (2016) 64–67. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.11.019>.

- [62] Y. Li, L. Wei, J. Cao, L. Qiu, X. Jiang, P. Li, Q. Song, H. Zhou, Q. Han, X. Diao, Oxidative stress , DNA damage and antioxidant enzyme activities in the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) when exposed to hypoxia and reoxygenation, *Chemosphere.* 144 (2016) 234–240. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.051>.

- [63] Z. Qian, T. Liu, Q. Liu, S. He, Y. Liu, F. Hou, X. Wang, X. Mi, C. Cai, X. Liu, P53 is involved in shrimp survival via its regulation roles on MnSOD and GPx in response to acute environmental stresses, *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 159 (2014) 38–51. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.09.009>.

Tables

Table 1. Primers used for dsRNA synthesis and for RT-qPCR analysis.

Primer	Gene Accession Number	Sequence (5'- 3')
T7GPx4AllFw	LOC113800343	GTTAATACGACTCACTATAGGGCATGGCTTCAGAGTC
T7GPx4Rv6	LOC113800343	GTTAATACGACTCACTATAGGGCATATACTTTTGGAGG
FwGPx4AllTv	LOC113800343	TCATGGCTTCAGAGTCAGCC
GPx4Rv6	LOC113800343	GACCTCCAAAAGTATATGTAAGAC
GPx4Rv2	LOC113800343	CAGCGTGAACTACACCGAGT
GPx2AllFw	LOC113819893	GAAGTTCCAGGGGAAGGTGGT
	LOC113819894	
GPx2AllRv	LOC113819893	TCGCCGAACTCTTCCTTGAGT
	LOC113819894	
L8F2	LOC113804304	TAGGCAATGTCATCCCCATT
L8R2	LOC113804304	TCCTGAAGGGAGCTTTACACG

Table 2. GPx4 silencing efficiency in shrimp hepatopancreas.

Condition	0 h, (p- value)	6 h, (p- value)	12 h, (p value)
Normoxia	23.90 %, (p > 0.05)	51.45 %, (p < 0.05)	81.43 %, (p < 0.05)
Hypoxia	-	46.76 %, (p < 0.05)	66.51 %, (p < 0.05)
Reoxygenation	-	62.03 %, (p < 0.05)	53.84 %, (p < 0.05)

Table 3. Concentrations of total glutathione, GSH, GSSG, and GSH/GSSG ratio in shrimp hepatopancreas during hypoxia, reoxygenation and GPx4 knock-down.

Treatment	Total glutathione ($\mu\text{mol/L}$)	GSH ($\mu\text{mol/L}$)	GSSG ($\mu\text{mol/L}$)	GSH/GSSG ratio
Normoxia 0 h SS	11.1 \pm 2.0 ^a	3.0 \pm 0.8 ^a	5.8 \pm 1.0 ^a	0.6 \pm 0.2 ^a
Normoxia 0 h dsGPx4	5.5 \pm 0.8 ^a	3.1 \pm 1.4 ^a	2.7 \pm 0.3 ^a	1.0 \pm 0.5 ^a
Normoxia 6 h SS	9.4 \pm 1.5 ^a	9.3 \pm 3.1 ^a	4.2 \pm 0.4 ^a	2.0 \pm 0.6 ^a
Normoxia 6 h dsGPx4	12.8 \pm 2.4 ^a	4.1 \pm 1.5 ^a	6.5 \pm 1.6 ^a	0.8 \pm 0.4 ^a
Hypoxia 6 h SS	16.8 \pm 1.0 ^b	4.6 \pm 1.8 ^a	8.6 \pm 0.4 ^a	0.5 \pm 0.2 ^a
Hypoxia 6 h dsGPx4	9.0 \pm 3.2 ^{ab}	7.8 \pm 5.4 ^a	4.1 \pm 1.3 ^a	1.3 \pm 0.5 ^a
Reoxygenation 6 h SS	19.6 \pm 9.1 ^{ab}	18.6 \pm 7.4 ^a	8.3 \pm 4.3 ^a	3.6 \pm 2.3 ^a
Reoxygenation 6h dsGPx4	9.1 \pm 1.8 ^{ab}	8.5 \pm 2.1 ^a	4.1 \pm 0.9 ^a	2.1 \pm 0.1 ^a
Normoxia 12 h SS	9.0 \pm 1.2 ^a	16.2 \pm 4.9 ^a	4.1 \pm 0.8 ^a	4.0 \pm 1.0 ^b
Normoxia 12h dsGPx4	11.8 \pm 2.2 ^a	10.1 \pm 1.8 ^a	5.4 \pm 1.1 ^a	2.3 \pm 0.6 ^{ab}
Hypoxia 12 h SS	11.8 \pm 2.7 ^a	6.5 \pm 2.6 ^a	5.7 \pm 1.4 ^a	1.3 \pm 0.5 ^a
Hypoxia 12 h dsGPx4	15.2 \pm 6.0 ^a	21.5 \pm 10.3 ^a	6.7 \pm 2.4 ^a	2.6 \pm 0.6 ^a
Reoxygenation 12 h SS	13.1 \pm 3.7 ^a	8.1 \pm 3.4 ^a	5.9 \pm 1.5 ^a	1.2 \pm 0.3 ^a
Reoxygenation 12 h dsGPx4	13.3 \pm 3.2 ^a	9.8 \pm 4.3 ^a	6.0 \pm 1.2 ^a	1.4 \pm 0.4 ^a

Data is expressed as mean \pm SEM (n=4). Different letters indicate statistical differences between normoxia, hypoxia and reoxygenation treatments at given time (p<0.05).

Figure captions

Figure 1. Gene expression of (A) total GPx4, and (B) total GPx2 during normoxia (N), hypoxia (H) and reoxygenation (R) in non-silenced (SS) and GPx4 knock-down (dsGPx4) shrimp at 0, 6 and 12 h. Data shown as mean \pm SEM (n=5). Different letters indicate statistical differences ($p < 0.05$).

Figure 2. Enzymatic activity of (A) total GPx, and (B) GPx4 in response to normoxia (N), hypoxia (H) and reoxygenation (R) in non-silenced (SS) and GPx4 knock-down (dsGPx4) shrimp at 0, 6 and 12 h. Data shown as mean \pm SEM (n=4). Different letters indicate statistical differences ($p < 0.05$).

Figures

Figure 1

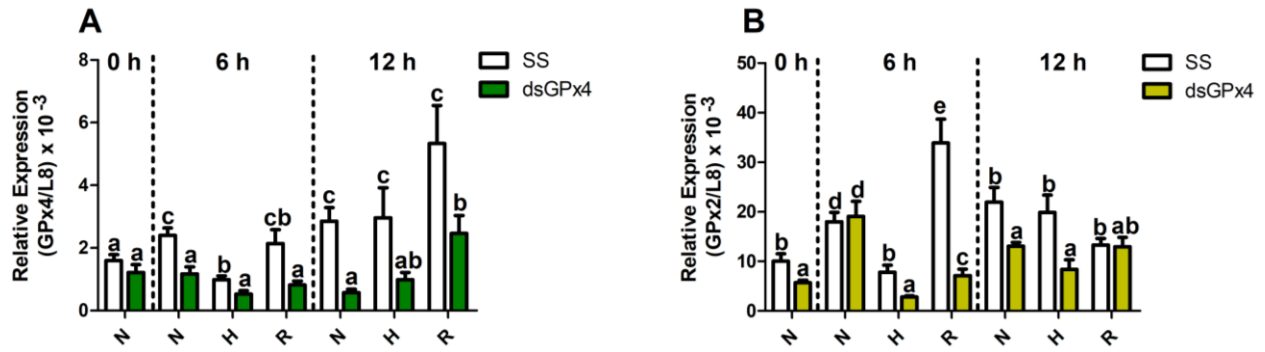
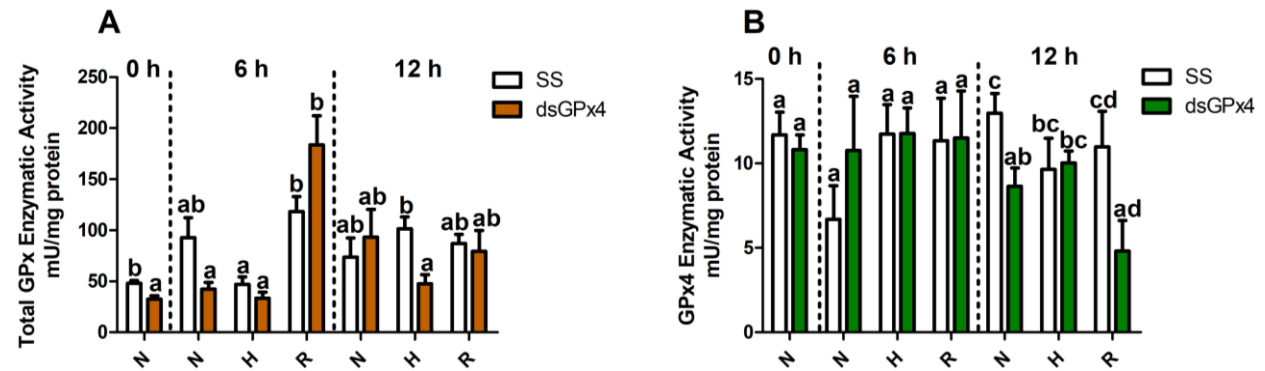


Figure 2



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1, Caracterización de la GPx4 de *L. vannamei*

Tras la búsqueda en la base de datos en la que se depositó la secuencia del genoma del camarón y el análisis de secuencias codificantes para GPx, se identificó que en el camarón blanco existen varios genes que codifican para isoformas de la GPx tal como ocurre en vertebrados (Margis *et al.*, 2008). Solo se encontró un gen codificante para la GPx4 que se compone por seis exones interrumpidos por cinco intrones que dan origen a cinco variantes de transcrito que producen dos isoformas de la enzima. Las secuencias de las variantes de transcrito de GPx4 del camarón fueron obtenidas experimentalmente y depositadas en la base de datos de NCBI con los siguientes números de acceso: GPx4TV1Lv, OL630777; GPx4TV2Lv, OL630778; GPx4TV3Lv, OL630779; GPx4TV4Lv, OL630780 y GPx4TV5Lv, OL630781.

En otros organismos como ratas y ratones, el uso de promotores diferentes para el inicio de la transcripción en sitios alternativos permite que al menos tres variantes de transcrito se produzcan a partir del gen de GPx4 y se generen las isoformas citosólicas, mitocondriales y nucleares (Imai *et al.*, 2006; Maiorino *et al.*, 2003). De manera similar en el camarón blanco, el inicio de la transcripción en sitios alternativos podría dar origen a las variantes de transcrito de la GPx4 ya que estas difieren únicamente en la longitud de su primer exón, sin embargo, se requiere profundizar más en este aspecto para definir los mecanismos exactos por los que esto ocurre.

El análisis *in silico* y búsqueda de elementos de regulación en la región promotora del gen de GPx4, indicó la presencia de secuencias consenso de reconocimiento para HIF-1, p53 y p63. En el humano, los genes de la GPx y GPx2, presentan elementos de respuesta a p53 (Tan *et al.*, 1999) y p63 (Yan y Chen 2006), respectivamente, mientras que los genes de GPx3 (Bierl *et al.*, 2004) y GPx8 (Bosello-Travain *et al.*, 2015), son regulados por HIF-1. Similarmente en la tilapia *Oreochromis niloticus*, los genes de GPx y MnSOD son regulados por p53 (Mai *et al.*, 2010). Es probable que de manera similar a lo que ocurre en vertebrados, en el camarón HIF-1, p53 y p63 intervengan en los cambios en la expresión de GPx4 en respuesta a estímulos específicos.

Por otro lado, el análisis de las secuencias de aminoácidos de las isoformas de la GPx4, GPx4 X1

y GPx4 X2, de 188 y 162 aminoácidos respectivamente, indicó la presencia de una señal peptídica en la GPx4 X1 que conduce a su localización mitocondrial, mientras que la GPx4 X2 es citosólica. En otros organismos como ratas (Maiorino *et al.*, 2003), ratones (Imai *et al.*, 2006) y el salmón del Pacífico (Wang *et al.*, 2012), se han identificado isoformas mitocondriales y citosólicas de la GPx4 (Imai *et al.*, 2006; Maiorino *et al.*, 2003). En ambas isoformas de la GPx4 se localizaron los residuos catalíticos de Sec, Gln y Trp embebidos en motivos altamente conservados.

A través del modelado por homología de la proteína, se predijo una estructura monomérica que presenta el plegamiento característico de tioredoxinas, que es común en proteínas que interactúan con grupos tioles como ocurre en las GPxs (Martin, 1995). La distribución espacial de los residuos catalíticos indicó que están dispuestos en proximidad con una orientación cercana a la superficie de la proteína, lo que posiblemente facilita su interacción con los hidropéroxidos de fosfolípidos de membrana. El análisis filogenético por su parte, indicó que ambas isoformas de la GPx4 de *L. vannamei* han divergido evolutivamente a través del tiempo de la GPx1, 2, 3, 5 y 6 de otros crustáceos, ubicándose así en el árbol filogenético en un clado separado en el que se agrupan con la GPx4 y GPx7 de otros crustáceos. Algunos estudios filogenéticos han sugerido que en mamíferos, la GPx7 ha surgido de la GPx4 como ancestro (Maiorino *et al.*, 2015), y es probable que esto haya ocurrido en crustáceos también.

Para conocer la distribución de la GPx4 en tejidos del camarón, se analizó la expresión de GPx4 en hepatopáncreas, branquias y músculo, que son tejidos con una alta actividad metabólica y por lo tanto podrían tener una elevada producción de ROS. Los resultados obtenidos indicaron que la GPx4 se expresa mayormente en hepatopáncreas seguido de branquias, mientras que en músculo, la expresión fue indetectable. En vertebrados, el selenio es acumulado y metabolizado principalmente en el hígado, en donde es incorporado a algunas selenoproteínas (Burk y Hill 2005). Aunque las rutas del selenio en invertebrados no se han detallado hasta el momento, es probable que guarden similitud con las de vertebrados.

En este sentido, el hepatopáncreas por sus similitudes funcionales con el hígado en mamíferos, podría involucrarse en la utilización del selenio y presentar una alta expresión de algunas selenoproteínas en comparación con otros tejidos. En *L. vannamei* la expresión de Sel M en hepatopáncreas es casi cuatro veces mayor que en branquias (García-Triana *et al.*, 2010). En este mismo organismo, la GPx3 presentó una alta expresión en hepatopáncreas en comparación con otros tejidos como el corazón, músculo, estómago y el pedúnculo ocular (Fan *et al.*, 2022). De

manera similar, en *P. monodon* la GPx4 tiene una alta expresión en hepatopáncreas en contraste con otros tejidos como el músculo, cerebro y ovarios (Li *et al.*, 2017).

Por otra parte, en el camarón la expresión de GPx4 en el músculo fue indetectable. En otros crustáceos como los camarones *Macrobrachium nipponense* (Xu *et al.*, 2020) y *P. monodon* (Li *et al.*, 2017), se ha detectado la expresión de GPx4 en músculo, aunque con niveles bajos en comparación con otros tejidos. A pesar de que todos los tejidos son capaces de sintetizar selenoproteínas, sus requerimientos pueden variar, lo que determinará sus patrones de expresión. En vertebrados, los receptores que facilitan la endocitosis del selenio en diferentes tejidos, Sepp1 y apoER2, tienen baja expresión en músculo en comparación con otros tejidos (Burk y Hill 2015), lo que puede afectar a la biosíntesis de selenoproteínas. Estos patrones de distribución del selenio podrían ser similares en crustáceos, ya que en *L. vannamei* la expresión de GPx4 en músculo resultó indetectable. En la carpa *Cyprinus carpio*, la acumulación de selenio ocurre principalmente en el riñón seguido del hígado, mientras que en el músculo la cantidad almacenada fue muy poca. En este mismo organismo, la suplementación con selenio dietario incrementó la actividad de GPx en el hígado a los 30 y 60 días de suplementación (Elia *et al.*, 2011). Similarmente, en el camarón blanco, la suplementación dietaria con selenio aumentó la actividad enzimática de GPx en el hepatopáncreas a las ocho semanas (Yu *et al.*, 2021).

4.2. Efecto de la Hipoxia y el Silenciamiento de p53 en la Expresión de GPx4 y el Contenido de Proteínas Carboniladas

Debido a que resultados previos indicaron que la GPx4 presenta una alta expresión en hepatopáncreas en contraste con otros tejidos, se decidió emplear este tejido para el resto de las evaluaciones. La eficiencia del silenciamiento de p53 en hepatopáncreas fue evaluada previamente por Nuñez-Hernandez y colaboradores (2021) quienes reportaron eficiencias de silenciamiento entre el 76.6 % y el 95.4.%.

El silenciamiento de p53, redujo la expresión de GPx4 en casi todos los tiempos evaluados, independientemente de las condiciones de oxigenación; durante la primera hora, la expresión de GPx4 se redujo hasta casi 2 veces. En vertebrados, p53 regula la expresión de enzimas antioxidantes como la GPx (Mai *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 1999), GPx2 (Yan and Chen 2006) y

MnSOD (Mai *et al.*, 2010). En invertebrados como *L. vannamei* (Qian *et al.*, 2014) y *P.monodon* (Li *et al.*, 2017), se ha sugerido que de manera similar p53 está involucrado en la respuesta antioxidante. Consistente con estos reportes y con los hallazgos del análisis *in silico* del promotor del gen de la GPx4, en el que fueron identificados elementos de respuesta de p53 y p63, así como con el análisis de la expresión de GPx4 en camarones silenciados, en *L. vannamei* p53 regula la expresión de GPx4 en el hepatopáncreas. Además, ocurrieron cambios significativos en el contenido de proteínas carboniladas durante el silenciamiento de p53.

El contenido de proteínas carboniladas es un buen indicador de estrés oxidativo, ya que se generan rápidamente durante el estrés y permanecen estables (Dalle-Donne *et al.*, 2003). Durante la primera hora, el contenido de proteínas carboniladas incrementó en camarones silenciados, mientras que a las 24 y 48 h hubo una marcada disminución. Esto indica que durante la primera hora ocurre un mayor daño oxidativo por efecto del silenciamiento de p53, pero que a las 24 y 48 h el estrés oxidativo es contenido y la cantidad de proteínas carboniladas disminuye. p53 regula diversos genes prooxidantes y antioxidantes, dependiendo del contexto celular, por lo que es probable que durante el silenciamiento de p53 sus respuestas sean alteradas induciendo cambios oxidativos (figura 3). Algunos de los genes regulados por p53 en mamíferos son el de la GPx, MnSOD (Mai *et al.*, 2010), GPx2 (Yan y Chen 2006) , SESN1, SESN2 y GPx1(Sablina *et al.*, 2005).

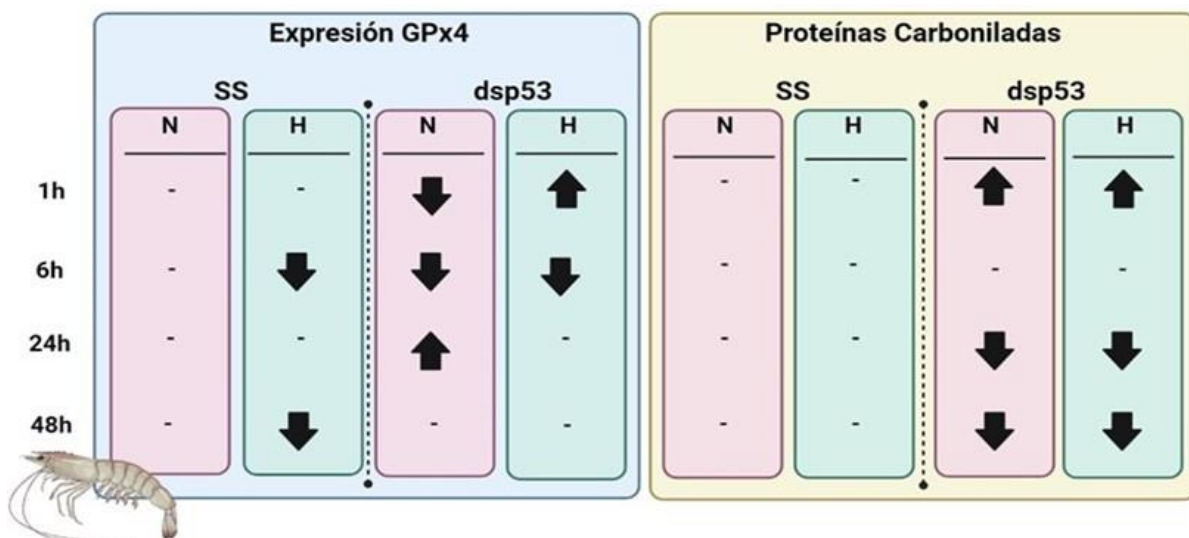


Figura 3. Cambios en la expresión de GPx4 y el contenido de proteínas carboniladas en respuesta a la hipoxia y el silenciamiento de p53. N: Normoxia; H: Hipoxia; SS: Organismos no silenciados; dsp53: Organismos silenciados en p53; -: Sin cambios significativos.

Por otro lado, el efecto de la hipoxia también indujo cambios interesantes en la expresión de GPx4. Durante la primera hora, en camarones no silenciados la expresión de GPx4 fue 1.38 veces mayor durante la hipoxia en comparación con su control en normoxia, sin embargo, el incremento no resultó estadísticamente significativo, mientras que en los silenciados, la expresión de GPx4 aumentó significativamente 2.08 veces en respuesta a hipoxia. En contraste, a las 6 h la expresión de GPx4 disminuyó en camarones silenciados y sin silenciar por efecto de la hipoxia, indicando que durante un periodo de hipoxia más prolongado, pueden ocurrir cambios adaptativos en la expresión de GPx4. Durante la hipoxia, la capacidad de adaptación de los organismos es clave para la resiliencia y una de las primeras respuestas adaptativas es el incremento en la expresión de genes antioxidantes (Giraud-Billoud *et al.*, 2019).

El aumento en la expresión de GPx4 en el hepatopáncreas de *L. vannamei* durante la primera hora podría reflejar una respuesta adaptativa temprana ante la baja disponibilidad de oxígeno. Sin embargo, es probable que durante un estrés más prolongado, como el de 6 h, las respuestas biológicas hayan sido modificadas para suplir las necesidades del organismo. Entre las respuestas más comunes al estrés prolongado por hipoxia se encuentra la depresión metabólica, durante la que ocurre una reducción de la tasa de transcripción y traducción con el fin de disminuir la biosíntesis de proteínas para el ahorro de energía (Hochachka 1997). En *L. vannamei*, la expresión de GPx en hepatopáncreas es regulada positivamente durante las primeras 4 h de hipoxia, pero a las 24 h ésta es regulada negativamente (Kniffin *et al.*, 2014). Similarmente, en el intestino medio y hepatopáncreas del camarón, la hipoxia media cíclica disminuyó la expresión de MnSOD y GPx tras un día de exposición (Han *et al.*, 2018).

Interesantemente, a las 24 h no se encontraron cambios significativos por efecto de la hipoxia tanto en camarones silenciados como no silenciados, pero a las 48 h hubo una disminución en la expresión de GPx4 en los organismos no silenciados por efecto de la hipoxia. Nuñez-Hernandez y colaboradores (2021), reportaron que en *L. vannamei*, la expresión de p53 en el hepatopáncreas disminuye significativamente a las 48 h por efecto de la hipoxia (Nuñez-Hernandez *et al.*, 2021), por lo que podría haber una regulación negativa de los genes responsivos a p53, entre ellos genes antioxidantes como el de la GPx4. Pese a esto, el contenido de proteínas carboniladas no presentó cambios a las 48 h por efecto de la hipoxia. En este sentido, es importante considerar que las respuestas prooxidantes y antioxidantes mediadas por p53 varían con el contexto celular, y aunque hay una regulación negativa en la expresión de GPx4 a las 48 h durante la hipoxia, existen otros

elementos de la respuesta antioxidante que podrían contribuir a mantener la homeostasis redox durante este tiempo y evitar así el daño oxidativo en biomoléculas.

4.3. Efecto del Silenciamiento de la GPx4 en la Expresión de GPx2 Durante la Hipoxia y Reoxigenación

Para estudiar con mayor profundidad las respuestas antioxidantes de la GPx4 y su regulación, se evaluó la expresión de GPx2 y GPx4 durante la hipoxia, reoxigenación y el silenciamiento de GPx4, para investigar si la modulación de la respuesta antioxidante de estas isoformas se encuentra interrelacionada y si esto influye en la respuesta antioxidante del camarón blanco ante condiciones de estrés como la hipoxia y reoxigenación. Para ello se realizó un bioensayo de silenciamiento de GPx4, hipoxia y reoxigenación. El silenciamiento de GPx4 fue efectivo alcanzando porcentajes de silenciamiento entre 23.90 y 81.43 % en hepatopáncreas.

En *L. vannamei*, tanto GPx2 como GPx4, se expresan en hepatopáncreas, aunque la GPx2 presentó una mayor expresión que GPx4 por lo que la respuesta antioxidante mediada por GPx2 podría ser mayor en este tejido. En mamíferos, la GPx2 se expresa en varios tejidos como los del sistema gastrointestinal, células epiteliales de pulmón y algunas células cancerígenas (Brigelius-Flohé y Kipp 2012). Previamente en el camarón blanco, Liu y colaboradores (2007) identificaron una GPx selenodependiente que no fue clasificada, sin embargo, ahora consistente con la secuencia del genoma del camarón se sabe que esta corresponde a una GPx2. Estos autores reportaron una amplia distribución de GPx2 en músculo, hepatopáncreas, branquias, intestino y hemocitos, lo que indica que la GPx2 en el camarón, a diferencia de lo que ocurre en mamíferos, se expresa en diferentes tejidos, incluyendo el hepatopáncreas en el que presentó alta expresión en comparación con la de GPx4.

Además, en vertebrados las isoformas de la GPx han demostrado estar involucradas en diferentes procesos biológicos gracias a que su especificidad por los sustratos es distinta, lo que les permite actuar en diferentes cascadas de señalización, por lo que su expresión se encuentra finamente regulada por distintas vías y puede presentar patrones diferentes de expresión (Stoytcheva y Berry 2009). La GPx2 tiene una especificidad de sustrato similar a la de la GPx1 con preferencia por los

hidroperóxidos del ácido linoleico, mientras que la GPx4 es una enzima más lipofílica con preferencia por los hidroperóxidos de membrana. Además, la GPx2 presenta preferencia por el GSH como electrodonador, mientras que la GPx4 no es tan selectiva y reacciona incluso con algunos tioles (Brigelius-Flohé y Kipp 2012).

En cuanto a las principales funciones de la GPx2 y GPx4, más allá de su rol como enzimas antioxidantes, en vertebrados, la GPx2 participa en el proceso anti-inflamatorio, la inhibición de la apoptosis y de la proliferación celular cancerígena (Brigelius-Flohé y Kipp 2012). Por otra parte, las funciones de la GPx4 se han asociado más a la protección de membranas, inhibición de la apoptosis (Imai y Nakagawa 2003; Nomura *et al.*, 2000), y como proteína estructural (Puglisi *et al.*, 2005; Ursini *et al.*, 1999). En ratón, varias selenoproteínas entre ellas la GPx1, GPx2, GPx3 y GPx4, presentaron diferencias en la abundancia de sus transcritos en el cerebro, testículos, hígado, riñón, pulmón, corazón, intestino y bazo (Hoffmann *et al.*, 2007). De manera similar, en hepatopáncreas de camarón, la GPx2 y GPx4 se expresan en diferente proporción lo que podría estar relacionado con la especificidad de sustrato, requerimientos tejido-específicos, así como las funciones específicas de cada una.

Interesantemente, el silenciamiento de GPx4 redujo la expresión de GPx2 a las 0, 6 y 12 h en la mayoría de los tratamientos. Durante la reducción o eliminación de uno de los elementos de la respuesta antioxidante puede promoverse el estrés oxidativo, por lo que podría esperarse el desarrollo de mecanismos compensatorios para evitar el daño oxidativo en el organismo. Sin embargo, este tipo de respuestas son dependientes del contexto celular, los genes implicados y las relaciones estrechas entre moléculas, ya que las GPxs como moléculas antioxidantes regulan los niveles de ROS en la célula, lo que puede modificar diferentes vías de trasducción de señales así como la activación de elementos de respuesta de algunos genes sensibles a ROS (Ansong *et al.*, 2014).

De acuerdo con lo anterior, varios reportes indican que algunas selenoproteínas pueden establecer distintas relaciones. En el ratón, el knock-out (KO) de GPx2 es compensado con la regulación positiva de GPx1 a nivel postraducciona en células de la cripta del colon, en donde GPx2 es preferencialmente expresada (Florian *et al.*, 2010). Por su parte, en células Caco-2, el KO de GPx1 no afecta la expresión de GPx2 y GPx4, que mantuvieron su habilidad para compensar la baja expresión de GPx1 (Gong *et al.*, 2012). Interesantemente en el ratón, la delección de la Sel P disminuyó la expresión de algunas selenoproteínas como la GPx1, GPx4 y Sel W, en diferentes

tejidos (Hoffmann *et al.*, 2007). En contraste, el KO de GPx1 en el ratón no afectó los niveles de mRNA de GPx3 y GPx4 en el pulmón y riñón, lo que indica que en este organismo los genes de la GPx1, GPx3 y GPx4 se expresan de manera independiente (Cheng *et al.*, 1997).

A pesar de que en vertebrados algunas de las respuestas y relación entre las isoformas de la GPx han sido evaluadas, muchos aspectos aún permanecen sin ser completamente comprendidos. Por su parte, los estudios de este tipo en invertebrados aún son pocos como para definir los mecanismos a través de los cuales las isoformas de la GPx intervienen en los cambios de expresión de otras isoformas. Sin embargo, la disminución en la expresión de GPx2 en hepatopáncreas del camarón por efecto del silenciamiento de GPx4 podría indicar que en este organismo, la expresión de estas dos isoformas de la GPx mantiene una relación de dependencia, en la que la GPx4 parece jugar un papel importante en la expresión de GPx2, pero los mecanismos por los que esto ocurre aún no son claros.

Por otro lado, en respuesta a hipoxia y reoxigenación, la GPx2 y GPx4 presentaron patrones de expresión similares ya que a las 6 h la expresión de GPx2 y GPx4 disminuyó por efecto de la hipoxia y se reestableció durante la reoxigenación en camarones no silenciados, mientras que a las 12 h no ocurrieron cambios estadísticamente significativos en su expresión. En *P. monodon*, la GPx1 y GPx7 tuvieron patrones de expresión diferentes en branquias y hepatopáncreas, en respuesta a la exposición a metales, cambios en la concentración salina e infección por patógenos (Liu *et al.*, 2018). Similarmente, en el pez dorado *Sparus aurata*, la expresión de GPx1 y GPx4 fue diferente en respuesta al estrés por confinamiento y ayuno (Malandrakis *et al.*, 2014).

Aun cuando en algunos organismos las isoformas de la GPx presentan diferentes patrones de expresión (Margis *et al.*, 2008), frente a estresores específicos, algunas de sus respuestas podrían converger para contrarrestar los efectos del estrés oxidativo, justo como parece ocurrir en el hepatopáncreas de *L. vannamei* durante la hipoxia y reoxigenación, en el que las respuestas de GPx2 y GPx4 convergen disminuyendo su expresión durante la hipoxia a las 6 h y restableciéndola durante la reoxigenación. Además, los cambios en la expresión de GPx2 y GPx4 podrían responder a cambios en la activación de factores de transcripción que podrían tener en común, como p53. En vertebrados, p53 es capaz de regular la expresión de enzimas antioxidantes como la MnSOD (Hussain *et al.*, 2004) y la GPx1 (Tan *et al.*, 1999), mientras que la expresión de GPx2 más bien es activada por p63, otra proteína de la familia de p53, aunque su función como enzima inhibidora de la apoptosis en células MCF-7 si es dependiente de p53 (Yan and Chen 2006).

En el camarón blanco se demostró que p53 es capaz de promover cambios en la expresión de GPx4 y esto mismo podría ocurrir con GPx2. En este mismo organismo, Nuñez-Hernandez y colaboradores (2021) encontraron que la expresión de p53 en el hepatopáncreas disminuye por efecto de la hipoxia a las 24 y 48 h. Asimismo, es probable que los cambios en la expresión de GPx2 y GPx4 en respuesta a hipoxia y reoxigenación se deban a una respuesta adaptativa ya que ante condiciones de estrés, la depresión metabólica suele ser una de las principales respuestas encaminadas a la supervivencia del organismo. Por lo tanto, es posible que a las 6 h ocurriera una disminución en la transcripción por el uso de energía para el mantenimiento de otras funciones necesarias para adaptarse y superar el estrés por hipoxia (Hochachka 1997), y restablecerse durante la reoxigenación.

4.4. Cambios en la Actividad Enzimática de GPx Total, GPx4 y el Contenido de Glutación Durante la Hipoxia, Reoxigenación y el Silenciamiento de GPx4

Para conocer cómo la respuesta antioxidante de GPx es afectada en respuesta a hipoxia y reoxigenación en camarones silenciados en GPx4, evaluamos la actividad enzimática de GPx total y GPx4, así como los cambios en el contenido de glutación, como indicador de cambios en el estado redox. De acuerdo con lo esperado, la actividad enzimática de GPx total resultó considerablemente mayor comparada con la de GPx4 en hepatopáncreas. El análisis de la secuencia del genoma del camarón publicada por Zhang y colaboradores (2019), indicó que en el camarón blanco existen al menos ocho genes que codifican para isoformas de la GPx (Cuadro 1), por lo que no es sorprendente que la actividad de GPx total resulte mayor que la de GPx4, ya que todas las isoformas de la GPx emplean al H_2O_2 como sustrato, pero solo la GPx4 es capaz de reducir hidroperóxidos de fosfolípidos (Brigelius-Flohé y Maiorino 2013).

Por otro lado, el silenciamiento de GPx4 no afectó la actividad enzimática de GPx total y GPx4, lo que indica que la respuesta antioxidante es mantenida aun cuando la expresión de GPx4 y GPx2 es reducida por efecto del silenciamiento de GPx4. Asimismo, el silenciamiento tampoco indujo cambios en el contenido de glutación ni en el estado redox, evaluado mediante la relación GSH/GSSG. Estos resultados sugieren que el estrés oxidativo no incrementa en hepatopáncreas

por efecto del silenciamiento de GPx4 y esto podría deberse a que la actividad enzimática de GPx4 no es afectada al silenciar GPx4. Además, es probable que durante el silenciamiento otras enzimas antioxidantes estuvieran contribuyendo a la homeostasis redox para evitar el desbalance oxidativo. En el cefalotórax del camarón *Fenneropenaeus chinensis*, el silenciamiento de GPx induce la expresión de CAT y peroxirredoxina (Prx), que también reducen el H₂O₂, lo que indica que existe una respuesta compensatoria a nivel transcripcional (Wang *et al.*, 2012). Por otra parte, hay que considerar que el silenciamiento conduce a la degradación del transcrito diana, sin embargo, la disminución en la concentración de proteína por efecto del silenciamiento puede tomar tiempo debido a que las tasas de transcripción y traducción no están exactamente acopladas y cada una es regulada por sus propias vías y distintos efectores (Hausser *et al.*, 2019). Además, la proteína presente previo al silenciamiento puede tomar tiempo en disminuir y por lo tanto en afectar la actividad enzimática.

Por su parte, la actividad enzimática de GPx total presentó cambios en respuesta a hipoxia y reoxigenación. A las 6 h, la actividad de GPx total no presentó cambios por efecto de la hipoxia, en camarones no silenciados, pero hubo un incremento durante la reoxigenación, mientras que a las 12 h no ocurrieron cambios en la actividad de GPx total. Parrilla-Taylor y Zenteno-Savín (2011), encontraron que en branquias del camarón blanco, la actividad de GPx, no cambia por efecto de la hipoxia, pero que durante la reoxigenación si incrementa significativamente. De manera similar, en el hepatopáncreas de este mismo organismo, la hipoxia de 24 h no indujo cambios en la actividad enzimática de GPx, pero durante la reoxigenación si aumentó (Estrada-Cárdenas *et al.*, 2021).

Estos reportes concuerdan con los resultados obtenidos a las 6 h, lo que sugiere que los cambios que ocurren durante la hipoxia y reoxigenación en la actividad enzimática de GPx total podrían ser inducidos desde horas tempranas. En el camarón, como en otros organismos, durante la adaptación a condiciones estresantes, las respuestas biológicas como ajustes en la actividad de algunas enzimas que contribuyen a su adaptación como las GPxs, pueden variar en función del tiempo. En el hepatopáncreas de *L. vannamei*, la hipoxia media cíclica de 1 día disminuyó la expresión de GPx y se restableció al tercer día, pero durante el día 14 y 28 volvió a disminuir (Han *et al.*, 2018).

Pese a las diferencias encontradas en la actividad enzimática de GPx total, la actividad de GPx4 no fue afectada por la hipoxia y reoxigenación, lo que sugiere que las respuestas de las isoformas podrían ser diferentes ante el estrés por hipoxia. La GPx4 es considerada como una enzima de alta

relevancia biológica por sus funciones estructurales (Puglisi *et al.*, 2005), antioxidantes y como citoprotector (Maiorino *et al.*, 2018). Además, se ha encontrado que la eliminación del gen de la GPx4 en ratones produce la muerte temprana en etapa embrionaria (Imai *et al.*, 2003). En contraste, otras isoformas de la GPx han sido consideradas como de menor relevancia biológica. En este sentido, es probable que durante la hipoxia, la biosíntesis y función de la GPx4 sea favorecida sobre otras isoformas de la GPx por su relevancia para el organismo, de manera similar a lo que ocurre durante la baja biodisponibilidad de selenio, donde la biosíntesis de GPx2 y GPx4 es priorizada sobre la de GPx1 y GPx3 (Schomburg and Schweizer 2009). En células HepG2, la hipoxia afecta la biosíntesis de selenoproteínas como la Sel P y deionidasas tipo 1, mientras que la expresión de GPx4 parece ser priorizada (Becker *et al.*, 2014).

Al analizar el contenido de GSH y GSSG, no se encontraron cambios significativos por efecto de la hipoxia y reoxigenación a las 6 y 12 h, pese a que ante condiciones de estrés, lo esperado es que el contenido de GSH disminuya por la reducción de ROS y que el GSSG incremente (Masella *et al.*, 2005). Aunque la hipoxia y reoxigenación son importantes estresores para el camarón, esto sugiere que ante estas condiciones las respuestas y mecanismos antioxidantes son capaces de evitar el desbalance y daño oxidativo en hepatopáncreas, ya que no solo no se encontraron cambios en el contenido de GSH y GSSG, sino que tampoco ocurrieron cambios en el contenido de proteínas carboniladas evaluado a las 1, 6, 24 y 48 h en respuesta a hipoxia. Pese a que los cambios en las concentraciones de GSH y GSSG fueron sutiles, a las 12 h el estado redox evaluado por la proporción GSH/GSSG, disminuyó notablemente durante la hipoxia y reoxigenación en camarones no silenciados. Aunque la respuesta antioxidante en el hepatopáncreas del camarón parece ser modulada desde horas tempranas durante la hipoxia y reoxigenación, con cambios en la expresión de GPx2 y GPx4 así como de la actividad enzimática de GPx4 y GPx total, es probable que ante un estrés prolongado ocurra el desbalance del estado redox (figura 4), ya que durante la hipoxia y reoxigenación en *L. vannamei* se desencadena una alta producción de ROS (Zenteno-Savín *et al.*, 2006), que puede resultar en daño oxidativo con incremento en el contenido de proteínas carboniladas (González-Ruiz *et al.*, 2020) y cambios en el estado redox.

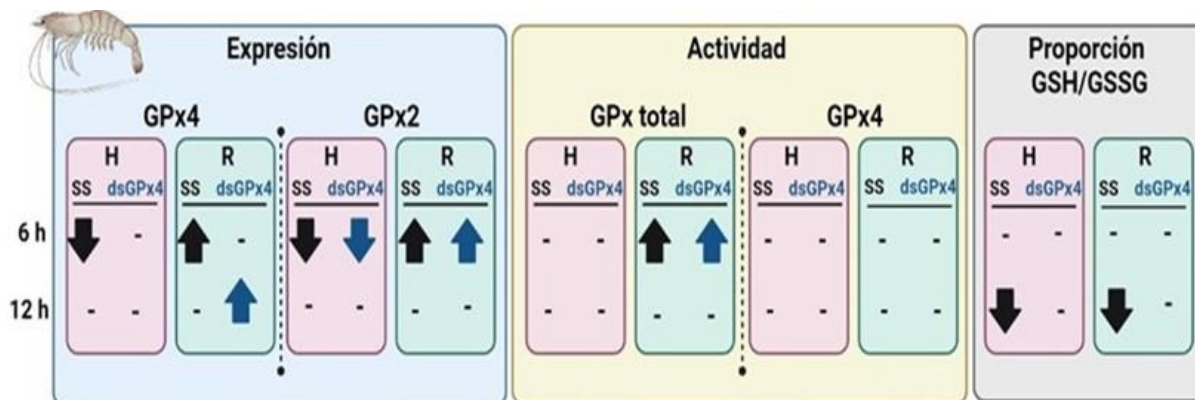


Figura 4. Cambios en la expresión de GPx4 y GPx2, actividad enzimática de GPx total y GPx4 y en la proporción GSH/GSSG por efecto de la hipoxia (H) y la reoxigenación (R) en camarones no silenciados (SS) y silenciados en GPx4 (dsGPx4). -: Sin cambios significativos.

En otros organismos, como el caracol *Helix aspersa*, el estado redox no es afectado por la anoxia y reoxigenación a las 5 h (Welker *et al.*, 2016). Similarmente, en el cangrejo *Neohelice granulata*, el estado redox, evaluado según la proporción GSH/GSSG en músculo, no es afectado a las 4 h por la hipoxia pero si por la reoxigenación (Geihs *et al.*, 2016). Por otro lado, en ratas Sprague-Dawley, la hipoxia y reoxigenación disminuyen la proporción GSH/GSSG en cerebro a las 6 h (Coimbra-Costa *et al.*, 2017). Algunas de las respuestas de estos organismos a estresores similares a los evaluados difieren de nuestros hallazgos en hepatopáncreas, sin embargo, es necesario considerar las diferencias en los tiempos de exposición, las características de los tejidos evaluados, así como la tolerancia a hipoxia de los organismos. Además, puede haber diferencias marcadas en los mecanismos de adaptación, que podrían influir en cambios en el estado redox entre los que podrían estar variaciones en la tasa de síntesis, reciclaje, metabolismo y glutationilación de proteínas (Forman 2016). Sin embargo, de acuerdo con nuestros hallazgos, el camarón blanco es un organismo resiliente capaz de tolerar cambios en las concentraciones de oxígeno disuelto como la hipoxia y la reoxigenación mediante la modulación de la respuesta antioxidante, en la que se involucran selenoproteínas como GPx2 y GPx4.

5. CONCLUSIONES

El camarón blanco cuenta con al menos ocho genes que codifican para isoformas de la GPx, entre ellos uno que codifica para la GPx4 y que produce cinco variantes de transcrito y dos isoformas con distinta localización celular. En hepatopáncreas del camarón blanco, la GPx2 y GPx4 son responsivas ante el estrés por hipoxia y reoxigenación desde horas tempranas, ya que en respuesta a estos estresores ocurren cambios importantes en la expresión génica y la actividad enzimática. Aunque la hipoxia y reoxigenación son estresores importantes para el camarón blanco, el estado redox en hepatopáncreas no es afectado por estas condiciones en tiempos tempranos (6 h). Sin embargo, ante condiciones prolongadas (12 h), el estado redox es alterado lo que podría traer consecuencias negativas para el camarón, aunque el contenido de proteínas carboniladas no presentó cambios por efecto de la hipoxia.

Por otro lado, la expresión de GPx4 está regulada por el factor de transcripción p53 y la expresión de GPx2 es afectada por cambios en la expresión de GPx4, lo que sugiere una interrelación entre estas dos selenoproteínas, sin embargo, los mecanismos aún no están claros.

6. RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos indican que en el camarón blanco existen varias isoformas de la GPx, sin embargo, solo unas cuantas han sido caracterizadas y estudiadas como la GPx2, GPx3 y GPx4, por lo que el estudio y caracterización de otras isoformas podría aportar información relevante para una comprensión más completa de la respuesta antioxidante y su regulación en este organismo. Por otro lado, en vertebrados, varias isoformas de la GPx se involucran en diferentes procesos biológicos más allá de su función antioxidante, por lo que el estudio de estas enzimas desde otra perspectiva podría aportar información novedosa.

7. REFERENCIAS

- Abele, Doris, and Susana Puntarulo. 2004. "Formation of Reactive Species and Induction of Antioxidant Defence Systems in Polar and Temperate Marine Invertebrates and Fish." *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* 138(4):405–15. doi: 10.1016/j.cbpb.2004.05.013.
- Ansong, Emmanuel, Wancai Yang, and Alan M. Diamond. 2014. "Molecular Cross-Talk between Members of Distinct Families of Selenium Containing Proteins." *Molecular Nutrition and Food Research* 58(1):117–23. doi: 10.1002/mnfr.201300543.
- Bandyopadhyay, Uday, Dipak Das, and Ranajit K. Banerjee. 1999. "Reactive Oxygen Species: Oxidative Damage and Pathogenesis." *Current Science* 77(5):658–66. doi: 10.2307/24102839.
- Becker, Niels Peter, Janine Martitz, Kostja Renko, Mette Stuedter, Sandra Hybsier, Thorsten Cramer, and Lutz Schomburg. 2014. "Hypoxia Reduces and Redirects Selenoprotein Biosynthesis." *Metallomics* 6(5):1079–86. doi: 10.1039/c4mt00004h.
- Bensaad, Karim, and Karen H. Vousden. 2007. "P53: New Roles in Metabolism." *Trends in Cell Biology* 17(6):286–91. doi: 10.1016/j.tcb.2007.04.004.
- Berlett, Barbara S., and Earl R. Stadtman. 1997. "Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress." *Journal of Biological Chemistry* 272(33):20313–16. doi: 10.1074/jbc.272.33.20313.
- Bierl, Charlene, Barbara Voetsch, Richard C. Jin, Diane E. Handy, and Joseph Loscalzo. 2004. "Determinants of Human Plasma Glutathione Peroxidase (GPx-3) Expression." *Journal of Biological Chemistry* 279(26):26839–45. doi: 10.1074/jbc.M401907200.
- Blair, Ian A. 2001. "Lipid Hydroperoxide-Mediated DNA Damage." *Experimental Gerontology* 36:1473–81.
- Bosello-Travain, Valentina, Henry J. Forman, Antonella Roveri, Stefano Toppo, Fulvio Ursini, Rina Venerando, Christina Warnecke, Mattia Zaccarin, and Matilde Maiorino. 2015. *Glutathione Peroxidase 8 Is Transcriptionally Regulated by HIF α and Modulates Growth Factor Signaling in HeLa Cells*. Vol. 81. Elsevier.
- Breitburg, Denise, Lisa A. Levin, Andreas Oeschlies, Marilaure Grégoire, Francisco P. Chavez, Daniel J. Conley, Véronique Garçon, Denis Gilbert, Dimitri Gutiérrez, Kirsten Isensee, Gil S. Jacinto, Karin E. Limburg, Ivonne Montes, S. W. A. Naqvi, Grant C. Pitcher, Nancy N. Rabalais, Michael R. Roman, Kenneth A. Rose, Brad A. Seibel, Maciej Telszewski, Moriaki Yasuhara, and Jing Zhang. 2018a. "Declining Oxygen in the Global Ocean and Coastal Waters." *Science* 359(6371):1395–1406. doi: 10.1126/science.aam7240.
- Brigelius-Flohé, Regina. 2006. "Glutathione Peroxidases and Redox-Regulated Transcription Factors." *Biological Chemistry* 387(10–11):1329–35. doi: 10.1515/BC.2006.166.
- Brigelius-Flohé, Regina, and Anna Patricia Kipp. 2012. "Physiological Functions of GPx2 and Its Role in Inflammation-Triggered Carcinogenesis." *Annals of the New York Academy of*

Sciences 1259(1):19–25. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06574.x.

- Brigelius-flohé, Regina, and Matilde Maiorino. 2013. “Glutathione Peroxidases.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1830(5):3289–3303. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.11.020.
- Budanov, Andrei V. 2014. “The Role of Tumor Suppressor P53 in the Antioxidant Defense and Metabolism.” *Sub-Cellular Biochemistry* 85:133–59. doi: 10.1007/978-94-017-9211-0.
- Buday, Katalin, and Marcus Conrad. 2020. “Emerging Roles for Non-Selenium Containing ER-Resident Glutathione Peroxidases in Cell Signaling and Disease.” *Biological Chemistry* 402(3):271–87. doi: 10.1515/hsz-2020-0286.
- Burk, Raymond F., and Kristina E. Hill. 2005. “Selenoprotein P: An Extracellular Protein with Unique Physical Characteristics and a Role in Selenium Homeostasis.” *Annual Review of Nutrition* 25:215–35. doi: 10.1146/annurev.nutr.24.012003.132120.
- Burk, Raymond F., and Kristina E. Hill. 2015. “Regulation of Selenium Metabolism and Transport.” *Annual Review of Nutrition* 35(1):109–34. doi: 10.1146/annurev-nutr-071714-034250.
- Burk, Raymond F., Kristina E. Hill, and Amy K. Motley. 2003. “Selenoprotein Metabolism and Function: Evidence for More than One Function for Selenoprotein P.” *The Journal of Nutrition* 133(5):1517S-1520S. doi: 10.1093/jn/133.5.1517S.
- Chandel, N. S., E. Maltepe, E. Goldwasser, C. E. Mathieu, M. C. Simon, and P. T. Schumacker. 1998. “Mitochondrial Reactive Oxygen Species Trigger Hypoxia-Induced Transcription.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(20):11715–20. doi: 10.1073/pnas.95.20.11715.
- Charmantier, Guy, Claude Soyeux, and Aquacop. 1994. “Effect of Molt Stage and Hypoxia on Osmoregulatory Capacity in the Peneid Shrimp *Penaeus Vannamei*.” *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 178(2):233–46. doi: 10.1016/0022-0981(94)90038-8.
- Cheng, Wen Hsing, Ye Shih Ho, Deborah A. Ross, Beth A. Valentine, Gerald F. Combs, and Xin Gen Lei. 1997. “Cellular Glutathione Peroxidase Knockout Mice Express Normal Levels of Selenium-Dependent Plasma and Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidases in Various Tissues.” *Journal of Nutrition* 127(8):1445–50. doi: 10.1093/jn/127.8.1445.
- Clavero-Salas, Alejandra, Rogerio R. Sotelo-Mundo, Teresa Gollas-Galván, Jorge Hernández-López, Alma Beatriz Peregrino-Uriarte, Adriana Muhlia-Almazán, and Gloria Yepiz-Plascencia. 2007. “Transcriptome Analysis of Gills from the White Shrimp *Litopenaeus Vannamei* Infected with White Spot Syndrome Virus.” *Fish and Shellfish Immunology* 23(2):459–72. doi: 10.1016/j.fsi.2007.01.010.
- Coimbra-Costa, Debora, Norma Alva, Mónica Duran, Teresa Carbonell, and Ramón Rama. 2017. “Oxidative Stress and Apoptosis after Acute Respiratory Hypoxia and Reoxygenation in Rat Brain.” *Redox Biology* 12(February):216–25. doi: 10.1016/j.redox.2017.02.014.
- Dalle-Donne, Isabella, Ranieri Rossi, Graziano Colombo, Daniela Giustarini, and Aldo Milzani. 2009. “Protein S-Glutathionylation: A Regulatory Device from Bacteria to Humans.” *Trends in Biochemical Sciences* 34(2):85–96. doi: 10.1016/j.tibs.2008.11.002.
- Dalle-Donne, Isabella, Ranieri Rossi, Daniela Giustarini, Aldo Milzani, and Roberto Colombo.

2003. "Protein Carbonyl Groups as Biomarkers of Oxidative Stress." *Clinica Chimica Acta* 329(1–2):23–38. doi: 10.1016/S0009-8981(03)00003-2.
- Duan, Yan, Xiumei Zhang, Xuxu Liu, and Dhanrajsingh N. Thakur. 2014. "Effect of Dissolved Oxygen on Swimming Ability and Physiological Response to Swimming Fatigue of Whiteleg Shrimp (*Litopenaeus Vannamei*)." *Journal of Ocean University of China* 13(1):132–40. doi: 10.1007/s11802-014-1974-1.
- El-Deiry, Wafik S., Scott E. Kern, Jennifer A. Pietenpol, Kenneth W. Kinzler, and Bert Vogelstein. 1992. "Definition of a Consensus Binding Site for P53." *Nature Genetics* 1:45–49.
- Elia, Antonia Concetta, Marino Prearo, Nicole Pacini, Ambrosius Josef Martin Dörr, and Maria Cesarina Abete. 2011. "Effects of Selenium Diets on Growth, Accumulation and Antioxidant Response in Juvenile Carp." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(2):166–73. doi: 10.1016/j.ecoenv.2010.04.006.
- Estrada-Cárdenas, Paulina, Dalia G. Cruz-Moreno, Ricardo González-Ruiz, Alma B. Peregrino-Uriarte, Lilia Leyva-Carrillo, Laura Camacho-Jiménez, Idania Quintero-Reyes, and Gloria Yepiz-Plascencia. 2021. "Combined Hypoxia and High Temperature Affect Differentially the Response of Antioxidant Enzymes, Glutathione and Hydrogen Peroxide in the White Shrimp *Litopenaeus Vannamei*." *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology* 254(January). doi: 10.1016/j.cbpa.2021.110909.
- Esworthy, R. Steven, Jeffrey R. Mann, Mindy Sam, and Fong Fong Chu. 2000. "Low Glutathione Peroxidase Activity in Gpx1 Knockout Mice Protects Jejunum Crypts from γ -Irradiation Damage." *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 279(2 42-2):426–36. doi: 10.1152/ajpgi.2000.279.2.g426.
- Fan, Jin Quan, Bin Bin Li, Qian Ming Hong, Ze Yu Yan, Xin Jun Yang, Ke Cheng Lu, Guo Liang Chen, Lei Wang, and Yi Hong Chen. 2022. "A Glutathione Peroxidase Gene from *Litopenaeus Vannamei* Is Involved in Oxidative Stress Responses and Pathogen Infection Resistance." *International Journal of Molecular Sciences* 23(1). doi: 10.3390/ijms23010567.
- Fang, Wenfeng, Marci L. Goldberg, Nicole M. Pohl, Xiuli Bi, Chang Tong, Bin Xiong, Timothy J. Koh, Alan M. Diamond, and Wancai Yang. 2010. "Functional and Physical Interaction between the Selenium-Binding Protein 1 (SBP1) and the Glutathione Peroxidase 1 Selenoprotein." *Carcinogenesis* 31(8):1360–66. doi: 10.1093/carcin/bgq114.
- Felix-Portillo, Monserrath, José A. Martínez-Quintana, Marina Arenas-Padilla, Verónica Mata-Haro, Silvia Gómez-Jiménez, and Gloria Yepiz-Plascencia. 2016. "Hypoxia Drives Apoptosis Independently of P53 and Metallothionein Transcript Levels in Hemocytes of the Whiteleg Shrimp *Litopenaeus Vannamei*." *Chemosphere* 161:454–62. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.07.041.
- Florian, Simone, Susanne Krehl, Maria Loewinger, Anna Kipp, Antje Banning, Steven Esworthy, Fong Fong Chu, and Regina Brigelius-Flohé. 2010. "Loss of GPx2 Increases Apoptosis, Mitosis, and GPx1 Expression in the Intestine of Mice." *Free Radical Biology and Medicine* 49(11):1694–1702. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.029.
- Forman, Henry Jay. 2016. "Glutathione - From Antioxidant to Post-Translational Modifier." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 595:64–67. doi: 10.1016/j.abb.2015.11.019.
- Fridovich, Irwin. 2004. "Mitochondria: Are They the Seat of Senescence?" *Aging Cell* 3(1):13–16.

doi: 10.1046/j.1474-9728.2003.00075.x.

- García-Triana, Antonio, Silvia Gómez-Jiménez, Alma Beatriz Peregrino-Urriarte, Alonso López-Zavala, Gustavo González-Aguilar, Rogerio R. Sotelo-Mundo, Elisa M. Valenzuela-Soto, and Gloria Yepiz-Plascencia. 2010. "Expression and Silencing of Selenoprotein M (SelM) from the White Shrimp *Litopenaeus Vannamei*: Effect on Peroxidase Activity and Hydrogen Peroxide Concentration in Gills and Hepatopancreas." *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* 155(2):200–204. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.10.037.
- Geihs, Márcio Alberto, Marcelo Alves Vargas, Fábio Everton Maciel, Olli Vakkuri, Victor Benno Meyer-Rochow, Silvana Allodi, and Luiz Eduardo Maia Nery. 2016. "Effects of Hypoxia and Reoxygenation on the Antioxidant Defense System of the Locomotor Muscle of the Crab *Neohelice Granulata* (Decapoda, Varunidae)." *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 186(5):569–79. doi: 10.1007/s00360-016-0976-2.
- Giraud-Billoud, Maximiliano, Georgina A. Rivera-Ingraham, Daniel C. Moreira, Thorsten Burmester, Alfredo Castro-Vazquez, Juan M. Carvajalino-Fernández, Alcir Dafre, Cuijuan Niu, Nelly Tremblay, Biswaranjan Paital, Rui Rosa, Janet M. Storey, Israel A. Vega, Wenyi Zhang, Gloria Yepiz-Plascencia, Tania Zenteno-Savin, Kenneth B. Storey, and Marcelo Hermes-Lima. 2019. "Twenty Years of the 'Preparation for Oxidative Stress' (POS) Theory: Ecophysiological Advantages and Molecular Strategies." *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology* 234(December 2018):36–49. doi: 10.1016/j.cbpa.2019.04.004.
- Girotti, Albert W. 1998. "Lipid Hydroperoxide Generation, Turnover, and Effector Action in Biological Systems." *Journal Of Lipid Research* 39:1529–42.
- Gong, G., C. Méplan, H. Gautrey, J. Hall, and J. E. Hesketh. 2012. "Differential Effects of Selenium and Knock-down of Glutathione Peroxidases on TNF α and Flagellin Inflammatory Responses in Gut Epithelial Cells." *Genes and Nutrition* 7(2):167–78. doi: 10.1007/s12263-011-0256-4.
- González-Ruiz, Ricardo, Omar Noé Granillo-Luna, Alma B. Peregrino-Urriarte, Silvia Gómez-Jiménez, and Gloria Yepiz-Plascencia. 2020. "Mitochondrial Manganese Superoxide Dismutase from the Shrimp *Litopenaeus Vannamei*: Molecular Characterization and Effect of High Temperature, Hypoxia and Reoxygenation on Expression and Enzyme Activity." *Journal of Thermal Biology* 88(October 2019). doi: 10.1016/j.jtherbio.2020.102519.
- González, Ricardo A., Fernando Díaz, Alexei Licea, Ana Denisse Re, L. Noemí Sánchez, and Zaul García-Esquivel. 2010. "Thermal Preference, Tolerance and Oxygen Consumption of Adult White Shrimp *Litopenaeus Vannamei* (Boone) Exposed to Different Acclimation Temperatures." *Journal of Thermal Biology* 35(5):218–24. doi: 10.1016/j.jtherbio.2010.05.004.
- Han, Si yin, Meng qiang Wang, Mei Liu, Bao jie Wang, Ke yong Jiang, and Lei Wang. 2018. "Comparative Sensitivity of the Hepatopancreas and Midgut in the White Shrimp *Litopenaeus Vannamei* to Oxidative Stress under Cyclic Serious/Medium Hypoxia." *Aquaculture* 490(November 2017):44–52. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.02.021.
- Hausser, Jean, Avi Mayo, Leeat Keren, and Uri Alon. 2019. "Central Dogma Rates and the Trade-

off between Precision and Economy in Gene Expression.” *Nature Communications* 10(1). doi: 10.1038/s41467-018-07391-8.

- Hochachka, P. 1997. “Oxygen: A Key Regulatory Metabolite in Metabolic Defense against Hypoxia.” *Oxford Journals* 37(6):595–603.
- Hoffmann, Peter R., Simone C. Höge, Ping An Li, Fukun W. Hoffmann, Ann C. Hashimoto, and Marla J. Berry. 2007. “The Selenoproteome Exhibits Widely Varying, Tissue-Specific Dependence on Selenoprotein P for Selenium Supply.” *Nucleic Acids Research* 35(12):3963–73. doi: 10.1093/nar/gkm355.
- Hussain, S. Perwez, Paul Amstad, Peijun He, Ana Robles, Shawn Lupold, Ichiro Kaneko, Masato Ichimiya, Sagar Sengupta, Leah Mechanic, Shu Okamura, Lorne J. Hofseth, Matthew Moake, Makoto Nagashima, Kathleen S. Forrester, and Curtis C. Harris. 2004. “P53-Induced Up-Regulation of MnSOD and GPx but Not Catalase Increases Oxidative Stress and Apoptosis.” *Cancer Research* 64(7):2350–56. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-2287-2.
- Ighodaro, O. M., and O. A. Akinloye. 2018. “First Line Defence Antioxidants-Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione Peroxidase (GPX): Their Fundamental Role in the Entire Antioxidant Defence Grid.” *Alexandria Journal of Medicine* 54(4):287–93. doi: 10.1016/j.ajme.2017.09.001.
- Imai, Hirotaka, Fumi Hirao, Taro Sakamoto, Kanae Sekine, Yumi Mizukura, Makoto Saito, Takeo Kitamoto, Michiko Hayasaka, Kazunori Hanaoka, and Yasuhito Nakagawa. 2003. “Early Embryonic Lethality Caused by Targeted Disruption of the Mouse PHGPx Gene.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305(2):278–86. doi: 10.1016/S0006-291X(03)00734-4.
- Imai, Hirotaka, and Yasuhito Nakagawa. 2003. “Biological Significance of Phospholipid Hydroperoxidase Glutathione Peroxidase (PHGPx, GPx4) in Mammalian Cells.” *Free Radical Biology and Medicine* 34(2):145–69.
- Imai, Hirotaka, Makoto Saito, Nozomu Kirai, Junya Hasegawa, Kumiko Konishi, Hiroyuki Hattori, Masuhiro Nishimura, Shinsaku Naito, and Yasuhito Nakagawa. 2006. “Identification of the Positive Regulatory and Distinct Core Regions of Promoters, and Transcriptional Regulation in Three Types of Mouse Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase.” *Journal of Biochemistry* 140(4):573–90. doi: 10.1093/jb/mvj186.
- Kipp, Anna P. 2017. *Selenium-Dependent Glutathione Peroxidases During Tumor Development*. Vol. 136. 1st ed. Elsevier Inc.
- Kniffin, Casey D, Louis E. Burnett, and Karen G. Burnett. 2014. “Recovery from Hypoxia and Hypercapnic Hypoxia: Impacts on the Transcription of Key Antioxidants in the Shrimp *Litopenaeus Vannamei*.” *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 170:43–49. doi: 10.1016/j.cbpb.2014.01.006.
- Kryukov, G. V., and V. N. Gladyshev. 2000. “Selenium Metabolism in Zebrafish: Multiplicity of Selenoprotein Genes and Expression of a Protein Containing 17 Selenocysteine Residues.” *Genes to Cells* 5(12):1049–60. doi: 10.1046/j.1365-2443.2000.00392.x.
- Labunskyy, Vyacheslav M., Dolph L. Hatfield, and Vadim N. Gladyshev. 2014. “Selenoproteins: Molecular Pathways and Physiological Roles.” *Physiological Reviews* 94(3):739–77. doi: 10.1152/physrev.00039.2013.

- Li, Chuanyu, and Robert Jackson. 2002. "Reactive Species Mechanisms of Cellular Hypoxia-Reoxygenation Injury." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 18(9):1096. doi: 10.1021/op500238t.
- Li, Fuxiang, Pengfei Wang, Chao Zhao, Weiyang Bao, and Lihua Qiu. 2017. "Cloning and Characterization of PHGPx and Its Synergistic Role with P53 in Mediating Stress in *Penaeus Monodon*." *Fish and Shellfish Immunology* 71(September):380–92. doi: 10.1016/j.fsi.2017.10.018.
- Li, Yuhu, Lin Wei, Jiangrong Cao, Liguang Qiu, Xiu Jiang, Ping Li, Qinqin Song, Hailong Zhou, Qian Han, and Xiaoping Diao. 2016. "Oxidative Stress, DNA Damage and Antioxidant Enzyme Activities in the Pacific White Shrimp (*Litopenaeus Vannamei*) When Exposed to Hypoxia and Reoxygenation." *Chemosphere* 144:234–40. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.08.051.
- Liu, Chun Hung, Mei Chen Tseng, and Winton Cheng. 2007. "Identification and Cloning of the Antioxidant Enzyme, Glutathione Peroxidase, of White Shrimp, *Litopenaeus Vannamei*, and Its Expression Following *Vibrio Alginolyticus* Infection." *Fish and Shellfish Immunology* 23(1):34–45. doi: 10.1016/j.fsi.2006.09.002.
- Liu, Wei, Chao Zhao, Pengfei Wang, Shu Wang, Heizhao Lin, and Lihua Qiu. 2018. "The Response of Glutathione Peroxidase 1 and Glutathione Peroxidase 7 under Different Oxidative Stresses in Black Tiger Shrimp, *Penaeus Monodon*." *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 217(November 2017):1–13. doi: 10.1016/j.cbpb.2017.12.009.
- Lobanov, Alexey V, Dmitri E. Fomenko, Yan Zhang, Aniruddha Sengupta, Dolph L. Hatfield, and Vadim N. Gladyshev. 2007. "Evolutionary Dynamics of Eukaryotic Selenoproteomes: Large Selenoproteomes May Associate with Aquatic Life and Small With." *Genome Biology* 8(9). doi: 10.1186/gb-2007-8-9-r198.
- Mai, Wei Jun, Jun Lun Yan, Lei Wang, Ying Zheng, Yu Xin, and Wei Na Wang. 2010. "Acute Acidic Exposure Induces P53-Mediated Oxidative Stress and DNA Damage in *Tilapia* (*Oreochromis Niloticus*) Blood Cells." *Aquatic Toxicology* 100(3):271–81. doi: 10.1016/j.aquatox.2010.07.025.
- Maiorino, Matilde, Valentina Bosello-Travain, Giorgio Cozza, Giovanni Miotto, Antonella Roveri, Stefano Toppo, Mattia Zaccarin, and Fulvio Ursini. 2015. "Understanding Mammalian Glutathione Peroxidase 7 in the Light of Its Homologs." *Free Radical Biology and Medicine* 83:352–60. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.017.
- Maiorino, Matilde, Marcus Conrad, and Fulvio Ursini. 2018. "GPx4, Lipid Peroxidation, and Cell Death: Discoveries, Rediscoveries, and Open Issues." *Antioxidants and Redox Signaling* 29(1):61–74. doi: 10.1089/ars.2017.7115.
- Maiorino, Matilde, Margherita Scapin, Fulvio Ursini, Mariangela Biasolo, Valentina Bosello, and Leopold Flohé. 2003. "Distinct Promoters Determine Alternative Transcription of Gpx-4 into Phospholipid-Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Variants." *Journal of Biological Chemistry* 278(36):34286–90. doi: 10.1074/jbc.M305327200.
- Malandrakis, Emmanouil E., Athanasios Exadactylos, Olga Dadali, Eleni Golomazou, Spiridon Klaoudatos, and Panagiota Panagiotaki. 2014. "Molecular Cloning of Four Glutathione Peroxidase (GPx) Homologs and Expression Analysis during Stress Exposure of the Marine

- Teleost Sparus Aurata.” *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* 168(1):53–61. doi: 10.1016/j.cbpb.2013.11.005.
- Margis, Rogerio, Christophe Dunand, Felipe K. Teixeira, and Marcia Margis-Pinheiro. 2008. “Glutathione Peroxidase Family - An Evolutionary Overview.” *FEBS Journal* 275(15):3959–70. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06542.x.
- Mariotti, Marco, Perry G. Ridge, Yan Zhang, Alexei V. Lobanov, Thomas H. Pringle, Roderic Guigo, Dolph L. Hatfield, and Vadim N. Gladyshev. 2012. “Composition and Evolution of the Vertebrate and Mammalian Selenoproteomes.” *PlosOne* 7(3). doi: 10.1371/journal.pone.0033066.
- Martin, Jennifer L. 1995. “Thioredoxin -a Fold for All Reasons.” *Structure* 3(3):245–50. doi: 10.1016/S0969-2126(01)00154-X.
- Masella, Roberta, Roberta Di Benedetto, Rosaria Vari, Carmela Filesi, and Claudio Giovannini. 2005. “Novel Mechanisms of Natural Antioxidant Compounds in Biological Systems: Involvement of Glutathione and Glutathione-Related Enzymes.” *Journal of Nutritional Biochemistry* 16(10):577–86. doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.05.013.
- Nomura, Kazuhiro, Hirotaka Imai, Tomoko Koumura, Toshihide Kobayashi, and Yasuhito Nakagawa. 2000. “Mitochondrial Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Inhibits the Release of Cytochrome c from Mitochondria by Suppressing the Peroxidation of Cardiolipin in Hypoglycaemia-Induced Apoptosis.” *Biochemical Journal* 351(1):183–93.
- Nomura, Kazuhiro, Hirotaka Imai, Tomoko Koumura, and Yasuhito Nakagawa. 2001. “Involvement of Mitochondrial Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase as an Antiapoptotic Factor.” *NeuroSignals* 10(1–2):81–92. doi: 10.1159/000046877.
- Nuñez-Hernandez, Dahlia, Laura Camacho-Jiménez, Lilia Leyva-Carrillo, Alma B. Peregrino-Uriarte, Elisa M. Valenzuela-Soto, Silvia Gómez-Jiménez, Humberto González-Ríos, and Gloria Yepiz-Plascencia. 2021. “Expression of P53 Isoforms in Response to Two Levels of Hypoxia and Effects of P53 Knock-down in Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase in the White Shrimp *Litopenaeus Vannamei*.” *Aquaculture Research* (September 2020):1–11. doi: 10.1111/are.15083.
- Nuñez-Hernandez, Dahlia M., Monserrath Felix-Portillo, Alma B. Peregrino-Uriarte, and Gloria Yepiz-Plascencia. 2018. “Cell Cycle Regulation and Apoptosis Mediated by P53 in Response to Hypoxia in Hepatopancreas of the White Shrimp *Litopenaeus Vannamei*.” *Chemosphere* 190:253–59. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.09.131.
- Olovnikov, Ivan A., Julia E. Kravchenko, and Peter M. Chumakov. 2009. “Homeostatic Functions of the P53 Tumor Suppressor: Regulation of Energy Metabolism and Antioxidant Defense.” *Seminars in Cancer Biology* 19(1):32–41. doi: 10.1016/j.semcancer.2008.11.005.
- Pan, Lu Qing, Lin Juan Zhang, and Hong Yu Liu. 2007. “Effects of Salinity and PH on Ion-Transport Enzyme Activities, Survival and Growth of *Litopenaeus Vannamei* Postlarvae.” *Aquaculture* 273(4):711–20. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.07.218.
- Parrilla-Taylor, Delia Patricia, and Tania Zenteno-Savín. 2011. “Antioxidant Enzyme Activities in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus Vannamei*) in Response to Environmental Hypoxia and Reoxygenation.” *Aquaculture* 318(3–4):379–83. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.05.015.

- Polyak, Kornelia, Yong Xia, Jay L. Zweier, Kenneth W. Kinzler, and Bert Vogelstein. 1997. "A Model for P53- Induced Apoptosis." *Letters to Nature* 389(September):300–305. doi: 10.1038/38525.
- Pörtner, Hans O., and Rainer Knust. 2007. "Climate Change Affects Marine Fishes through the Oxygen Limitation of Thermal Tolerance." *Science* 315(5808):95–97. doi: 10.1126/science.1135471.
- Pradedova, E. V., O. D. Isheeva, and R. K. Salyaev. 2011a. "Classification of the Antioxidant Defense System as the Ground for Reasonable Organization of Experimental Studies of the Oxidative Stress in Plants." *Russian Journal of Plant Physiology* 58(2):210–17. doi: 10.1134/s1021443711020166.
- Puglisi, Rossella, Federica Tramer, Gianfranco Carlomagno, Loredana Gandini, Enrico Panfili, Mario Stefanini, Andrea Lenzi, Franco Mangia, and Carla Boitani. 2005. "PHGPx in Spermatogenesis: How Many Functions?" *Contraception* 72(4):291–93. doi: 10.1016/j.contraception.2005.03.002.
- Qian, Zhaoying, Tao Liu, Qiao Liu, Shulin He, Yongjie Liu, Fujun Hou, Xianzong Wang, Xiao Mi, Chen Cai, and Xiaolin Liu. 2014. "P53 Is Involved in Shrimp Survival via Its Regulation Roles on MnSOD and GPx in Response to Acute Environmental Stresses." *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 159(1):38–51. doi: 10.1016/j.cbpc.2013.09.009.
- Racotta, Ilie, Elena Palacios, and Lia Méndez. 2002. "Metabolic Responses to Short and Long-Term Exposure to Hypoxia in White Shrimp (*Penaeus Vannamei*)." *Distribution* 25(3):367–70. doi: 10.1080/1023624021000019333.
- Sablina, Anna A., Andrei V. Budanov, Galina V. Ilyinskaya, Larissa S. Agapova, Julia E. Kravchenko, and Peter M. Chumakov. 2005. "The Antioxidant Function of the P53 Tumor Suppressor." *Nature Medicine* 11(12):1306–13. doi: 10.1038/nm1320.
- Schieber, Michael, and Navdeep S. Chandel. 2014. "ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress." *Current Biology* 24(10):R453–62. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034.
- Schomburg, Lutz, and Ulrich Schweizer. 2009. "Hierarchical Regulation of Selenoprotein Expression and Sex-Specific Effects of Selenium." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1790(11):1453–62. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.03.015.
- Stoytcheva, Zoia R., and Marla J. Berry. 2009. "Transcriptional Regulation of Mammalian Selenoprotein Expression." *Biochimica et Biophysica Acta* 1790(11):1429–40. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.05.012. Transcriptional.
- Tan, Mingjia, Shijun Li, Manju Swaroop, Kunliang Guan, Larry W. Oberley, and Yi Sun. 1999. "Transcriptional Activation of the Human Glutathione Peroxidase Promoter by P53." *Journal of Biological Chemistry* 274(17):12061–66. doi: 10.1074/jbc.274.17.12061.
- Tian, Ran, Yuepan Geng, Ying Yang, Inge Seim, and Guang Yang. 2021. "Oxidative Stress Drives Divergent Evolution of the Glutathione Peroxidase (GPX) Gene Family in Mammals." *Integrative Zoology* 16(5):696–711. doi: 10.1111/1749-4877.12521.
- Toppo, Stefano, Stefano Vanin, Valentina Bosello, and Silvio C. E. Tosatto. 2008. "Evolutionary and Structural Insights into the Multifaceted Glutathione Peroxidase (Gpx) Superfamily."

Antioxidants and Redox Signaling 10(9):1501–13. doi: 10.1089/ars.2008.2057.

- Trasviña-arenas, Carlos H., Antonio Garcia-triana, Alma B. Peregrino-uriarte, and Gloria Yepiz-plascencia. 2013. “White Shrimp *Litopenaeus Vannamei* Catalase: Gene Structure, Expression and Activity under Hypoxia and Reoxygenation.” *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 164:44–52.
- Turrens, Julio F. 2003. “Mitochondrial Formation of Reactive Oxygen Species.” *Journal of Physiology* 552(2):335–44. doi: 10.1113/jphysiol.2003.049478.
- Ursini, Fulvio, Sabina Heim, Michael Kiess, Matilde Maiorino, Antonella Roveri, Josef Wissing, and Leopold Flohé. 1999. “Dual Function of the Selenoprotein PHGPx during Sperm Maturation.” *Science* 285(5432):1393–96. doi: 10.1126/science.285.5432.1393.
- Valko, Marian, Dieter Leibfritz, Jan Moncol, Mark T. D. Cronin, Milan Mazur, and Joshua Telser. 2007a. “Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease.” *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 39(1):44–84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.
- Wang, Dongdong, Fuhua Li, Yanhong Chi, and Jianhai Xiang. 2012. “Potential Relationship among Three Antioxidant Enzymes in Eliminating Hydrogen Peroxide in Penaeid Shrimp.” *Cell Stress and Chaperones* 17(4):423–33. doi: 10.1007/s12192-011-0317-z.
- Wang, Lu, Sean M. Harris, Herbert M. Espinoza, Valerie McClain, and Evan P. Gallagher. 2012. “Characterization of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Metabolizing Peroxidase (Gpx4) Isoforms in Coho Salmon Olfactory and Liver Tissues and Their Modulation by Cadmium.” *Aquatic Toxicology* 114–115:134–41. doi: 10.1016/j.aquatox.2012.02.025.
- Welker, Alexis F., Daniel C. Moreira, Élide G. Campos, and Marcelo Hermes-lima. 2013. “Role of Redox Metabolism for Adaptation of Aquatic Animals to Drastic Changes in Oxygen Availability.” *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 165(4):384–404. doi: 10.1016/j.cbpa.2013.04.003.
- Welker, Alexis F., Daniel C. Moreira, and Marcelo Hermes-Lima. 2016. “Roles of Catalase and Glutathione Peroxidase in the Tolerance of a Pulmonate Gastropod to Anoxia and Reoxygenation.” *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 186(5):553–68. doi: 10.1007/s00360-016-0982-4.
- Xu, Lei, Ming Yang, Hongtuo Fu, Shengming Sun, Hui Qiao, Wenyi Zhang, Yongsheng Gong, Sufei Jiang, Yiwei Xiong, Shubo Jin, and Yan Wu. 2020. “Molecular Cloning, Expression, and in Situ Hybridization Analysis of MnGPx-3 and MnGPx-4 from Oriental River Prawn, *Macrobrachium Nipponense*, in Response to Hypoxia and Reoxygenation.” *PLoS ONE* 15(2):1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0229171.
- Yan, Wensheng, and Xinbin Chen. 2006. “GPX2, a Direct Target of P63, Inhibits Oxidative Stress-Induced Apoptosis in a P53-Dependent Manner.” *Journal of Biological Chemistry* 281(12):7856–62. doi: 10.1074/jbc.M512655200.
- Yu, Qiuran, Zhenqiang Fu, Maoxian Huang, Chang Xu, Xiaodan Wang, Jian G. Qin, Liqiao Chen, Fenglu Han, and Erchao Li. 2021. “Growth, Physiological, Biochemical, and Molecular Responses of Pacific White Shrimp *Litopenaeus Vannamei* Fed Different Levels of Dietary Selenium.” *Aquaculture* 535(December 2020). doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.736393.

- Zenteno-Savín, Tania, Ricardo Saldierna, and Mauricio Ahuejote-Sandoval. 2006. "Superoxide Radical Production in Response to Environmental Hypoxia in Cultured Shrimp." *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 142(3-4 SPEC. ISS.):301–8. doi: 10.1016/j.cbpc.2005.11.001.
- Zhang, Xiaojun, Jianbo Yuan, Yamin Sun, Shihao Li, Yi Gao, Yang Yu, Chengzhang Liu, Quanchao Wang, Xinjia Lv, Xiaoxi Zhang, Ka Yan Ma, Xiaobo Wang, Wenchao Lin, Long Wang, Xueli Zhu, Chengsong Zhang, Jiquan Zhang, Songjun Jin, Kuijie Yu, Jie Kong, Peng Xu, Jack Chen, Hongbin Zhang, Patrick Sorgeloos, Amir Sagi, Acacia Alcivar-Warren, Zhanjiang Liu, Lei Wang, Jue Ruan, Ka Hou Chu, Bin Liu, Fuhua Li, and Jianhai Xiang. 2019b. "Penaeid Shrimp Genome Provides Insights into Benthic Adaptation and Frequent Molting." *Nature Communications* 10(1). doi: 10.1038/s41467-018-08197-4.