



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

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS ISOFORMAS DE
LA HEXOCINASA DEL CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus
vannamei* Y SU EXPRESIÓN GÉNICA EN HIPOXIA Y
REOXIGENACIÓN**

Por:

Marissa Andrea Flores Saucedo

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Marissa Andrea Flores Saucedo, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



M. C. Alma Beatriz Peregrino Uriarte

Directora de Tesis



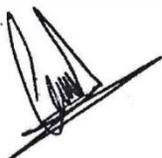
Dra. Gloria Yepiz Plascencia

Integrante del comité de tesis



Dra. Silvia Gómez Jiménez

Integrante del comité de tesis



Dra. Laura Camacho Jiménez

Integrante del comité de tesis

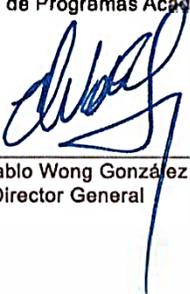
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Caracterización Molecular de las Isoformas de la Hexocinasa del Camarón Blanco *Litopenaeus vannamei* y su Expresión Génica en Hipoxia y Reoxigenación” 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 Marissa Andrea Flores Saucedo, 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



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero otorgado para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo por brindarme el espacio para cursar el programa de posgrado, así como a la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal.

Al proyecto financiado por CONACyT de Ciencia Básica A1-S-24557 “Modulación de glucólisis y gluconeogénesis durante la hipoxia en camarón blanco” aprobado a la Dra. Gloria Yepiz Plascencia que proporcionó el financiamiento para realizar este estudio.

A mi directora de tesis, M.C. Alma Peregrino Uriarte por su guía y enseñanzas que han sido un pilar muy importante en mi formación académica, porque aprendí mucho de usted en muchos sentidos. Pero sobre todo, por todo el apoyo y cariño que me permitieron continuar con este proyecto. Muchas gracias de todo corazón.

A la Dra. Gloria Yepiz Plascencia por darme un espacio en su grupo de trabajo, por su confianza en mí, por sus consejos y recomendaciones para mejorar mi trabajo. Por ser un ejemplo de dedicación y por siempre compartir sus conocimientos.

A la Dra. Laura Camacho Jiménez por el apoyo y orientación desde mi proyecto de licenciatura, por las observaciones y consejos que siempre me has brindado.

A la Dra. Silvia Gómez Jiménez por su asesoría en este proyecto, por sus acertados comentarios y observaciones que apoyaron a enriquecer la tesis, por su apoyo en el área experimental.

A la M.C. Lilia Leyva Carrillo por su gran ayuda y disponibilidad en el laboratorio para facilitar el trabajo experimental.

A mis compañeras y amigas del Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica: Laura Estefany, Paulina y Dalia por su compañía, ayuda y consejos, dentro y fuera del laboratorio.

A mis amigas Angélica y Frida por siempre escucharme y estar al pendiente de mí. Gracias por su amistad y cariño, las quiero.

A mi familia: mis tíos, primos y sobrinos por los momentos que compartimos y por su amor. Son una parte fundamental en mi vida y estoy agradecida de tenerlos. Especialmente a Paola, muchas gracias por tu cariño. A Francisco Alday, por hacer feliz a mi hermana, gracias por ser un gran amigo y siempre estar al pendiente.

A mi papá por ser mi sostén, por tu amor infinito y tus muestras de cariño en todo momento. Gracias por nunca dejarme sola. Eres el mejor papá.

A mi hermano, por tu amor, por tu gestos diarios de cariño y apoyo. A Ubaldina, muchas gracias por todo lo que haces por nosotras, por tu amor y consejos, por ser siempre tan buena. A mis sobrinos, Daniel y Andrés, los quiero con todo mi corazón.

A Marcela por ser mi compañera y mejor amiga, por las risas y lágrimas. Gracias por todo lo que haces por mí, siento tu amor en cada palabra y gesto que tienes conmigo. Estoy muy orgullosa de ti, de ser tu hermana.

A Julio César por creer en mí, por impulsarme y siempre estar presente, por compartir conmigo. Agradezco a la vida por permitirnos crecer juntos. Te amo.

El agradecimiento más especial es para mi hermana Ana Laura, porque siempre estuviste para nosotras, por todo tu amor, por ser un ejemplo de bondad y valentía para todos los que tuvimos la dicha de conocerte, te admiro mucho y sigo aprendiendo de ti. Te amo hermana, sé que sigues aquí.

DEDICATORIA

*Con todo mi amor para Ana Laura,
seguiremos juntas siempre.*

*A mi mamá,
te extraño como el primer día.*

Este trabajo fue realizado en el laboratorio que dirige la Dra. Gloria Yepiz Plascencia en la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. El apoyo financiero para su realización fue proporcionado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a través del proyecto de Ciencia Básica A1-S-24557 “Modulación de glucólisis y gluconeogénesis durante la hipoxia en camarón blanco”.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE CUADROS	11
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES	16
2.1. Cultivo de Importancia Económica: Camarón Blanco <i>Litopenaeus vannamei</i>	16
2.2. La Hipoxia como Mayor Estresor en Crustáceos.....	17
2.2.1. Consecuencias de la Hipoxia en el Camarón Blanco.....	19
2.2.2. Estrategias del Camarón Blanco en Respuesta a la Hipoxia.....	19
2.3. Cambios en el Metabolismo Energético del Camarón Inducidos por Hipoxia.....	21
2.4. Glucólisis Anaerobia en Respuesta a la Hipoxia.....	21
2.4.1. Primer Punto de Control en la Glucólisis: Hexocinasa.....	23
2.4.2. Isoformas de la Hexocinasa en Vertebrados e Invertebrados.....	26
3. HIPÓTESIS	30
4. OBJETIVOS	31
4.1. Objetivo General.....	31
4.2. Objetivos Específicos.....	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS	32
5.1. Análisis del Genoma y Transcriptoma de <i>L. vannamei</i> en la Búsqueda de Isoformas Anotadas de la Hexocinasa.....	32
5.2. Caracterización Molecular de las Isoformas de la Hexocinasa.....	32
5.2.1. Diseño de Oligonucleótidos.....	32
5.2.2. Amplificación y Clonación.....	33
5.3. Análisis Bioinformáticos de las Secuencias de las Isoformas de la Hexocinasa.....	34
5.3.1. Deducción de las Secuencias Aminoacídicas de las Isoformas de la Hexocinasa.....	34
5.3.2. Alineamiento Múltiple de Secuencias.....	35
5.3.3. Análisis Filogenético.....	35
5.3.4. Modelación por Homología de la Estructura Tridimensional de las Isoformas de la Hexocinasa.....	37
5.4. Bioensayo de Hipoxia e Hipoxia con Reoxigenación.....	37

CONTENIDO (continuación)

5.5. Evaluación de la Expresión Relativa de Isoformas de la Hexocinasa.....	38
5.5.1. Extracción de RNA Total y Síntesis de cDNA.....	38
5.5.2. Cuantificación de la Expresión Relativa por RT-qPCR.....	39
5.6. Análisis Estadístico.....	40
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
6.1. Las HKs Anotadas en el Genoma y Transcriptoma de <i>L. vannamei</i>	41
6.2. Secuencias Codificantes de las Isoformas de la HK de <i>L. vannamei</i>	45
6.3. Análisis Bioinformático de las Isoformas HK-1 y HK-2 de <i>L. vannamei</i>	51
6.3.1. Comparación de las Secuencias Aminoacídicas de las Isoformas de la HK por Alineamientos Múltiples.....	51
6.3.2. Modificaciones Postraduccionales de las HKs de <i>L. vannamei</i>	55
6.3.3. Análisis Filogenético.....	56
6.3.4. Estructura Tridimensional de las Isoformas de la HK de <i>L. vannamei</i>	59
6.4. Expresión Relativa de las Isoformas de la HK por Tejido.....	61
6.5. Efecto de la Hipoxia y Reoxigenación en la Expresión de las Isoformas de la HK.....	63
7. CONCLUSIONES.....	68
8. RECOMENDACIONES.....	69
9. REFERENCIAS.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Niveles de oxígeno bajos y en descenso en el océano abierto y en aguas costeras.....	18
2	Glucólisis: destino del piruvato en presencia o ausencia de oxígeno.....	24
3	Destinos metabólicos de la glucosa-6-fosfato (G-6-P).....	25
4	Estructura del gen y de las variantes de transcrito de la HK-2 de <i>L. vannamei</i> y ubicación de un sitio de unión de HIF-1 en la región UTR-5'.....	41
5	Electroforesis de los productos de PCR de las secuencias de las isoformas de la HK.....	45
6	Análisis de clones recombinantes mediante PCR de colonia.....	46
7	Secuencia de nucleótidos y deducida de aminoácidos de la isoforma HK-1 larga de <i>L. vannamei</i>	48
8	Secuencia de nucleótidos y deducida de aminoácidos de la isoforma HK-1 corta de <i>L. vannamei</i>	49
9	Secuencia de nucleótidos y deducida de aminoácidos de la isoforma HK-2 de <i>L. vannamei</i>	50
10	Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de HK-1 de <i>L. vannamei</i> y otras especies.	53
11	Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de HK-2 de <i>L. vannamei</i> y otras especies.	54
12	Análisis filogenético de las secuencias de la HK de diversas especies.....	58
13	Modelado por homología de la estructura tridimensional de las isoformas de HK de <i>L. vannamei</i>	59
14	Expresión relativa por tejido de las isoformas de la HK de <i>L. vannamei</i> en condiciones de normoxia.	61
15	Efecto de la hipoxia y la reoxigenación sobre la expresión relativa de la isoforma HK-1 total de <i>L. vannamei</i> en branquias y hepatopáncreas.....	64
16	Efecto de la hipoxia y la reoxigenación sobre la expresión relativa de la isoforma HK-2 total de <i>L. vannamei</i> en branquias y hepatopáncreas.....	65

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Secuencias aminoacídicas de isoformas de la HK de diversas especies utilizadas en el alineamiento múltiple y/o análisis filogenético.....	36
2	Análisis de las secuencias de HK anotadas en el genoma y transcriptoma de <i>L. vannamei</i>	43
3	Oligonucleótidos diseñados y utilizados para amplificar las secuencias codificantes de las isoformas de la HK de <i>L. vannamei</i> y para evaluar su expresión por RT-qPCR.....	44

RESUMEN

El camarón blanco *Litopenaeus vannamei* es el crustáceo más importante para la acuicultura a nivel mundial. Frecuentemente, el desarrollo del camarón en su hábitat y en cultivo puede afectarse por la incidencia de hipoxia. *L. vannamei* responde a la hipoxia ajustando el metabolismo energético y activando la glucólisis anaerobia. La hexocinasa (HK) cataliza la fosforilación de glucosa para generar glucosa-6-fosfato (G-6-P), un metabolito central en el metabolismo de carbohidratos. La HK está presente en la mayoría de los organismos en varias isoformas tejido-específicas con propiedades características. Anteriormente, nuestro grupo de trabajo reportó una secuencia de HK de *L. vannamei*, que corresponde a la isoforma HK-1, según la reciente anotación del genoma del camarón, y se encontró anotada una segunda isoforma denominada HK-2. El objetivo del presente estudio fue caracterizar las isoformas de la HK de *L. vannamei*, evaluar su expresión por tejido en condiciones normales y evaluar el efecto de la hipoxia y la reoxigenación sobre su expresión en branquias y hepatopáncreas. Se amplificaron mediante PCR dos secuencias de la HK-1 del camarón denominadas HK-1 larga y HK-1 corta, así como una secuencia de la isoforma HK-2 identificada como la variante X3 en las bases de datos de GenBank. Las isoformas de la HK del camarón están altamente conservadas en secuencia y estructura con las HKs de otras especies, tienen un peso molecular similar a las de otros homólogos de invertebrados y son filogenéticamente más cercanas a las HKs conocidas de otros crustáceos. Los resultados de expresión génica indicaron que la isoforma HK-1 se expresa mayormente en hepatopáncreas, mientras que la isoforma HK-2 predomina en branquias. Estos resultados sugieren que la expresión de las isoformas de la HK es tejido-específica. Además, la hipoxia disminuyó la expresión total de HK-1 en hepatopáncreas y branquias, pero después de 1 h de reoxigenación se restauró a los niveles detectados en normoxia. Por otro lado, la expresión total de la HK-2 fue afectada diferencialmente en ambos tejidos. En hepatopáncreas, la expresión de HK-2 aumentó en respuesta a la hipoxia, pero volvió a niveles de normoxia después de 1 h de reoxigenación. En branquias, la HK-2 disminuyó significativamente por la hipoxia, pero también se restauró después de 1 h de reoxigenación. Estos resultados indican que la expresión de las isoformas HK del camarón responde a la hipoxia y reoxigenación, de manera tejido-específica.

Palabras clave: Hexocinasa, *Litopenaeus vannamei*, Hipoxia, Glucólisis, Expresión génica

ABSTRACT

The white shrimp *Litopenaeus vannamei* is the most important crustacean for aquaculture worldwide. Frequently, the growth of shrimp in its natural habitat and in aquaculture ponds can be affected by the occurrence of hypoxia. *L. vannamei* responds to hypoxia by adjusting its energy metabolism by activating anaerobic glycolysis. Hexokinase (HK) catalyzes the phosphorylation of glucose to generate glucose-6-phosphate (G-6-P), a central metabolite in carbohydrate metabolism. HK is present in most organisms in various tissue-specific isoforms with distinctive properties. Previously, our group reported an HK sequence from *L. vannamei*, which corresponds to the HK-1 isoform, according to the recent annotation of the shrimp genome, and a second isoform named HK-2 was identified in the genome. The aim of this study was to characterize the HK isoforms from *L. vannamei*, evaluate their expression under normoxia in gills, hepatopancreas and muscle, and evaluate the effect of hypoxia and reoxygenation on its expression in gills and hepatopancreas. Two shrimp HK-1 sequences named HK-1 long and HK-1 short, as well as the sequence of the isoform HK-2, were amplified by PCR. Shrimp HK isoforms are highly conserved in sequence and structure with HKs from other species, have a similar molecular mass to their invertebrate counterparts, and are phylogenetically closer to other known crustacean HKs. Gene expression results indicated that the HK-1 isoform is expressed mostly in hepatopancreas, while the HK-2 isoform prevail in gills. These results suggest that the expression of HK isoforms is tissue-specific. Furthermore, hypoxia decreased the expression of total HK-1 in hepatopancreas and gills, but after 1 h of reoxygenation it was restored to normoxia levels. On the contrary, the total expression of HK-2 was differentially affected in both tissues. In hepatopancreas, expression of HK-2 increased in response to hypoxia but returned to normoxia levels after 1 h of reoxygenation. In gills, HK-2 expression was significantly decreased by hypoxia, but was also restored after 1 h of reoxygenation. These results indicate that the expression of shrimp HK isoforms responds to hypoxia and reoxygenation, in a tissue-specific manner.

Key words: Hexokinase, *Litopenaeus vannamei*, Hypoxia, Glycolysis, Gene Expression

1. INTRODUCCIÓN

El camarón blanco *Litopenaeus vannamei* es una de las principales especies de crustáceos que se producen a nivel mundial (FAO, 2018), es originario de la costa del Pacífico y se encuentra desde las costas de Sonora, México, hasta Perú en Sudamérica. En México, la producción de este peneido se realiza principalmente en el noroeste, cerca de las zonas costeras donde se encuentran esteros y lagunas o bahías (Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca, 2017). Sin embargo, el desarrollo y reproducción de esta especie marina pueden ser afectados en su hábitat natural y en condiciones de cultivo debido a diversas situaciones de estrés como la disminución en la concentración de oxígeno disuelto (OD), condición conocida como hipoxia (Vaquer-Sunyer y Duarte, 2008). Las variaciones en los niveles de OD son comunes en los ecosistemas marinos, con ciclos de hipoxia seguidos por periodos de reoxigenación. Sin embargo, durante los últimos años se ha registrado el aumento de zonas hipóxicas en mar abierto y en zonas costeras, causado principalmente por la eutrofización de los mares debido a actividades antropogénicas, aunado al aumento de temperatura ocasionado por el cambio climático (Breitburg *et al.*, 2018; Diaz y Rosenberg, 2008).

La exposición prolongada a concentraciones de OD menores a 2 mg O₂/L puede afectar negativamente el desarrollo de las especies marinas. A pesar de que el camarón se considera una especie tolerante a la hipoxia, debido a que sobrevive durante periodos de tiempo relativamente largos, se ha demostrado que la hipoxia tiene consecuencias perjudiciales en su tasa de crecimiento, reproducción y sistema inmune (Han *et al.*, 2017; Racotta *et al.*, 2002). Sin embargo, *L. vannamei* puede recurrir a diversas estrategias en respuesta a la hipoxia, como la supresión de la actividad metabólica, la reducción en el consumo de oxígeno y la aceleración de la producción de energía por medio de la glucólisis anaerobia (Seibel, 2011; Ulaje *et al.*, 2019).

Debido a la importancia de la vía glucolítica en el metabolismo de los organismos, se deben tener mecanismos de control para regular la ruta eficientemente. Las reacciones catalizadas por la hexocinasa (HK), la fosfofructocinasa (PFK) y piruvato cinasa (PK) son irreversibles, por lo que son puntos clave en la regulación de la vía. La HK (ATP: hexosa-6-fosfotransferasa, E.C. 2.7.1.1; HK) cataliza el primer paso del metabolismo de oxidación de las hexosas al fosforilar a la glucosa utilizando ATP, y se obtiene glucosa-6-fosfato (G-6-P) como producto. Esta reacción es de gran

importancia ya que la G-6-P es un metabolito central en el metabolismo (Stryer *et al.*, 2013). Esta enzima pertenece a una familia conservada presente en la mayoría de los organismos que difieren en sus propiedades catalíticas y reguladoras, en su masa molecular y en su distribución tisular. En mamíferos, las isoformas de la HK han sido ampliamente estudiadas en distintas condiciones (Cárdenas *et al.*, 1998; Wilson, 2003), sin embargo, las HKs de invertebrados, y más aún de crustáceos marinos, han sido poco estudiadas en comparación con las de mamíferos.

En la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, se encontraron cuatro isoenzimas expresadas en diferentes etapas de desarrollo y en diferentes tejidos (Jayakumar *et al.*, 2001). En crustáceos se ha reportado la actividad de la HK en el cangrejo *Neohelice granulata* (Lauer *et al.*, 2012), y en las especies de langostas *Homarus americanus* y *Homarus vulgaris* (Stetten y Goldsmith, 1981). En el 2017, Sun *et al.*, reportaron la secuencia de la HK en el camarón *Macrobrachium nipponense*, así como el aumento en su expresión relativa en respuesta a la hipoxia en los tejidos de hepatopáncreas y músculo.

Por otra parte, en el camarón blanco *L. vannamei*, Soñanez-Organis *et al.*, en el 2011 reportaron una secuencia de la HK, así como su regulación mediante el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) en condiciones de bajo OD. En este estudio, la exposición por 1 y 24 h a la hipoxia (1.5 mg/L de O₂/L) aumentó la expresión y actividad de HK en branquias, sin embargo, en músculo hubo una menor expresión de HK, pero aumentó la actividad. Esto sugiere la presencia de isoformas en los diferentes tejidos. Aunado a esto, el genoma del camarón blanco *L. vannamei* fue recientemente publicado en la base de datos del GenBank en el NCBI, donde se encuentran anotadas 3 variantes de transcrito del gen la HK-2 que codifican a 3 proteínas deducidas de diferente tamaño (Zhang *et al.*, 2019). Además, en el transcriptoma publicado por Ghaffari *et al.*, (2014) también están presentes las secuencias de estas variantes de transcrito de la HK-2, así como la HK-1 reportada por Soñanez-Organis *et al.* (2011).

Las respuestas metabólicas a la hipoxia en crustáceos incluyen diversos mecanismos. Debido a que existen muy pocos estudios en crustáceos que describan a las enzimas clave que participan en la regulación de estos procesos, es necesario la generación de este conocimiento. En particular, la HK juega un papel importante en la regulación de la glucólisis y, en consecuencia, en la estrategia metabólica del camarón para adaptarse a bajas concentraciones de OD. Por lo que, el presente trabajo tiene como objetivo identificar y caracterizar las isoformas de la HK del camarón blanco *L. vannamei* y evaluar el efecto de la hipoxia y reoxigenación sobre su expresión génica.

2. ANTECEDENTES

2.1. Cultivo de Importancia Económica: Camarón Blanco *Litopenaeus vannamei*

Durante el 2016, se reportó una producción en la acuicultura a nivel mundial de 7.8 millones de toneladas de crustáceos, con un valor de 57,100 millones de USD. En particular, los camarones peneidos dominan por más del 50% la acuicultura de crustáceos. El camarón blanco *L. vannamei* es el crustáceo que más se produce a nivel mundial, seguido del cangrejo de las marismas *Procambarus clarkii*, el langostino jumbo *Penaeus monodon*, el camarón *M. nipponense*, entre otros. La producción y consumo de crustáceos están ampliamente globalizados y su cultivo es un componente significativo en el crecimiento del sector de la acuicultura. Además, los crustáceos son considerados de gran valor económico en la exportación a nivel mundial, por lo que su cultivo se considera de gran importancia tanto para países desarrollados como en vías de desarrollo (Bondad-Reantaso *et al.*, 2012; FAO, 2018).

Como se mencionó anteriormente, los camarones peneidos son las principales especies de crustáceos que se producen. En México, la producción de camarón se realiza en el Pacífico, el Golfo de México y el Caribe, tanto por pesca de captura como de cultivo. El camarón es el producto pesquero más importante a nivel nacional en términos de exportación, valor económico y generación de empleo (Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca, 2017; FAO, 2018). El camarón blanco es originario de la costa del Pacífico y se encuentra desde las costas de Sonora, México, hasta Perú en Sudamérica. Su cultivo se desarrolla generalmente cerca de las costas donde se encuentran esteros y lagunas costeras o bahías. Actualmente también es cultivado en otras regiones del mundo, siendo la principal especie cultivada (Gillett, 2008). La razón de esto es porque el cultivo de *L. vannamei* no presenta grandes complicaciones durante el desarrollo larvario, tiene una alta tasa de crecimiento en comparación con los cultivos de otras especies de camarón, además de tener bajos requerimientos de proteína en la dieta. Asimismo, se ha mostrado su tolerancia a amplios intervalos de temperatura y salinidad (Martínez-Córdova *et al.*, 1999; Sánchez-Paz *et al.*, 2006). Lo anterior, ha posicionado al camarón blanco como la principal especie de interés para cultivo.

A pesar de que el cultivo de camarones peneidos ha aumentado notablemente durante las últimas décadas, tanto en el Pacífico como en países asiáticos, existen diversos factores que limitan la producción de estas especies, especialmente en términos de productividad, así como en pérdidas de los cultivos. Se ha reportado que factores externos comprometen el crecimiento del camarón, además de aumentar la tasa de mortalidad en los cultivos y en hábitats naturales (Han *et al.*, 2017; Racotta *et al.*, 2002). Por esto es importante identificar y estudiar las causas y consecuencias de los estresores que afectan al camarón y a otros crustáceos de importancia para la acuicultura.

2.2. La Hipoxia como Mayor Estresor en Crustáceos

Las especies marinas pueden estar expuestas a diversos factores de estrés en condiciones de cultivo y en su hábitat natural. Para los organismos acuáticos se define como estrés a la condición donde se presente una alteración de la homeostasis del organismo en respuesta a estímulos externos. Los organismos desencadenan una serie de respuestas y cambios, tanto en comportamiento, como bioquímicos y fisiológicos, que tienen como objetivo la adaptación del individuo a la situación de estrés (Wendelaar Bonga, 1997). Dependiendo de la intensidad del estresor, la respuesta puede ser de dos niveles. En el primer nivel la respuesta es con fines adaptativos donde el organismo puede recuperar la homeostasis. El segundo nivel resulta en la supresión del metabolismo energético, inhibición del crecimiento, afectación en la reproducción y susceptibilidad a infecciones (Carreño Mejía, 2009). Entre los principales agentes estresantes que pueden afectar al camarón, en su medio natural y en cultivo, están los cambios bruscos de temperatura, alteraciones en la concentración de OD y en la salinidad, y la presencia de microorganismos patógenos (Han *et al.*, 2017).

El nivel de OD es considerado uno de los factores más importantes en el cultivo de crustáceos y otras especies marinas, en especial de *L. vannamei*, ya que es un sustrato esencial para el mantenimiento de las funciones fisiológicas de los organismos aerobios (Pérez-Rostro *et al.*, 2004). En los ecosistemas marinos, el oxígeno presente en la atmósfera o el originado por fotosíntesis, se disuelve en las aguas superficiales y las del fondo, ayudando así a satisfacer las necesidades respiratorias de todos los organismos que habitan el ecosistema. Sin embargo, cuando se corta el suministro de oxígeno en la superficie y/o en el fondo del océano o cuando la tasa de consumo supera al reabastecimiento, la concentración de oxígeno cae por debajo del punto en el que se

sustenta la vida de la mayoría de los organismos. Esta condición de bajo OD es conocida como hipoxia (Gobler y Baumann, 2016; Keeling *et al.*, 2010).

Las zonas con bajo OD son una característica común en los ecosistemas marinos (Fig. 1). Esta situación puede ser ocasionada por factores naturales como el aumento en la demanda biológica del oxígeno, una disminución en las corrientes de agua, cambios en la marea o fluctuaciones de temperatura. Sin embargo, existen otras situaciones derivadas de actividades antropogénicas, que han exacerbado la disminución de OD en los océanos durante las últimas décadas. Las concentraciones bajas de OD en costas y mar abierto pueden tener corta duración, siendo restablecidas a los niveles de OD normales, lo que se conoce como reoxigenación. Sin embargo, la hipoxia puede persistir por tiempos prolongados y extenderse hasta miles de kilómetros cuadrados afectando a una gran variedad de especies (Breitburg *et al.*, 2018; Diaz y Rosenberg, 2008).

El punto en el que los organismos acuáticos son afectados por la hipoxia varía ampliamente, en general este inicia cuando la concentración de OD se encuentra por debajo de 2 mg/L. Aunque se ha reconocido que, a una concentración de oxígeno dada, que puede ser crítica para una especie bajo ciertas circunstancias, puede no serlo para esa misma especie en otra situación, o tampoco serlo para otra especie (Seibel, 2011). El camarón *L. vannamei* se considera una especie tolerante a la hipoxia, ya que sobrevive durante periodos relativamente largos, sin embargo, no está definida una concentración de oxígeno letal en específico. A pesar de esta tolerancia, se ha demostrado que la hipoxia tiene consecuencias negativas para el camarón en distintos niveles (Racotta *et al.*, 2002).

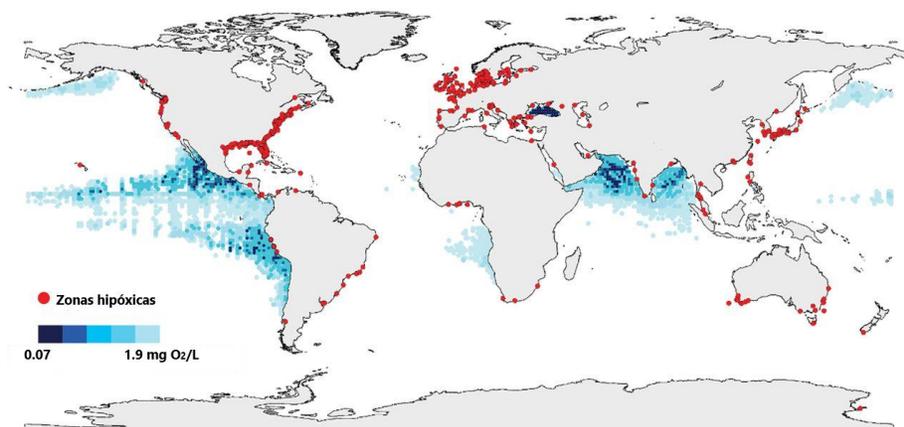


Figura 1. Niveles de oxígeno bajos y en descenso en océano abierto y aguas costeras. El mapa indica las zonas donde los nutrientes antropogénicos han causado disminuciones de O₂ a <2 mg/L (puntos rojos), así como las zonas de mínimo de oxígeno del océano a 300 m de profundidad (regiones sombreadas en azul). Fuente: Breitburg *et al.*, 2018.

2.2.1. Consecuencias de la Hipoxia en el Camarón Blanco

Los ajustes fisiológicos y bioquímicos que las especies realizan como una estrategia ante el estrés pueden repercutir eventualmente de forma perjudicial en el organismo (Wu, 2002). Las alteraciones en la concentración óptima de OD pueden ocasionar en el camarón una disminución en el crecimiento, reducción de la locomoción, mayor riesgo a infecciones y el aumento en la tasa de mortalidad (Han *et al.*, 2017; Martins de Lima *et al.*, 2021; Pérez-Rostro *et al.*, 2004).

Diversos estudios reportan que cualquier nivel de hipoxia puede causar un deterioro en el crecimiento, aunque no se vea afectada la sobrevivencia del organismo (Wu, 2002). Para el camarón *L. vannamei* se ha reportado que la hipoxia reduce la ingesta de alimento, y es probable que esto sea la principal causa de la disminución del crecimiento. Se ha demostrado que niveles bajos de OD reducen el consumo de alimento debido a la debilitación del sistema digestivo (Han *et al.*, 2017). En este estudio, Han *et al.* (2017) reportaron una baja actividad de tripsina, lo que probablemente resulte en el descenso del suministro de energía metabólica, provocando una reducción de la supervivencia y el crecimiento del *L. vannamei*. Además, los autores también reportaron que la hipoxia cíclica durante 28 días aumenta la mortalidad y reduce la resistencia a *Vibrio parahaemolyticus* como resultado de las deficiencias en el mecanismo de osmorregulación y de la inhibición de enzimas digestivas. La hipoxia tiene un efecto directo en el sistema inmune del organismo haciéndolo más propenso a infecciones por patógenos, lo que probablemente conduce a brotes de enfermedades infecciosas y al aumento en la mortalidad. Por esto, es fundamental estudiar las repercusiones de las bajas concentraciones de OD en el camarón.

2.2.2. Estrategias del Camarón Blanco en Respuesta a la Hipoxia

Las especies de crustáceos que habitan los ecosistemas marinos, como el camarón blanco, son más propensas a experimentar fluctuaciones de la concentración de OD, por lo que deben responder mediante adaptaciones morfológicas, fisiológicas y de comportamiento. Para poder responder fisiológica y conductualmente a los cambios de la concentración de OD, el camarón debe tener

sistemas sensoriales capaces de detectar estos cambios y activar los sistemas motores apropiados para responder adecuadamente. Los sistemas de ventilación y circulación permiten al camarón responder al cambio en los niveles de OD del medio. La tasa de ventilación y el volumen de oxígeno que ingresa al organismo puede regularse rápidamente, además de la inducción del aumento en la afinidad de la hemocianina por el oxígeno, disminución del metabolismo energético y la activación de rutas anaerobias. La mayoría de estos cambios tardan en producirse, por lo que los cambios conductuales, que pueden ser casi instantáneos, suelen ser la respuesta más eficaz y rápida a la del organismo frente a la hipoxia (Martins de Lima *et al.*, 2021). Sin embargo, cuando se prolonga la exposición, o el camarón no es capaz de transportarse a sitios con mayores niveles de oxígeno, el cambio en el metabolismo energético es esencial para su sobrevivencia.

Existe una relación directa entre el OD, el consumo de oxígeno, la producción de energía y el metabolismo aerobio, indicando la interacción entre el metabolismo y el sistema respiratorio en crustáceos (Semenza, 1998). Un punto clave en la estrategia frente a la hipoxia en animales es la presencia del factor de transcripción HIF-1 (factor inducible por hipoxia) que confiere una respuesta adaptativa multifacética a bajas concentraciones de OD y se considera el máximo regulador de la homeostasis del oxígeno al inducir la expresión de genes específicos, aquellos que contienen en los promotores elementos de respuesta a la hipoxia (HRE) (Gorr *et al.*, 2006). HIF-1 es una proteína heterodimérica compuesta por las subunidades α y β expresadas constitutivamente. En presencia de oxígeno, HIF-1 α es hidroxilada en residuos conservados del dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD), después interactúa con la proteína von Hippel-Lindau (pVHL) y reconocen al complejo proteína-ubiquitina ligasa que marca a HIF-1 α para su degradación por el proteosoma. En condiciones de hipoxia, HIF-1 α no es hidroxilada, por lo que se dimeriza con HIF-1 β e interactúa con los HRE ubicados en la región promotora de genes implicados en la respuesta a la hipoxia (Gorr *et al.*, 2010; Soñanez-Organis *et al.*, 2009). Todos los sitios de unión de HIF-1 contienen la secuencia consenso 5'-(A/G)CGTG-3' (Semenza, 1996). En *L. vannamei* se reportó la expresión tejido-específica de HIF-1 (Soñanez-Organis *et al.*, 2009), y se encontró que está involucrado en la regulación de genes del metabolismo energético en camarones sometidos a hipoxia, en particular de genes de enzimas glucolíticas (Camacho-Jiménez *et al.*, 2019; Cota-Ruiz *et al.*, 2016; Soñanez-Organis *et al.*, 2011, 2012).

2.3. Cambios en el Metabolismo Energético del Camarón Inducidos por Hipoxia

El camarón responde al estrés hipóxico mediante el uso y movilización de glucosa de las reservas de glucógeno como una estrategia metabólica para mantener la homeostasis y demanda de energía (Martins de Lima *et al.*, 2021; Ulaje *et al.*, 2019). En específico, debido a la exposición a la hipoxia, en *L. vannamei* se presentan cambios en el nivel de expresión de genes que codifican a enzimas glucolíticas, así como en su actividad, como se ha reportado para la hexocinasa (HK) (Soñanez-Organis *et al.*, 2011), fosfofructocinasa (PFK) (Cota-Ruiz *et al.*, 2015), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Camacho-Jiménez *et al.*, 2018) y lactato deshidrogenasa (LDH) (Soñanez-Organis *et al.*, 2012); y gluconeogénicas como fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBP) (Cota-Ruiz *et al.*, 2015) y fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK) (Reyes-Ramos *et al.*, 2018). La regulación de las enzimas del metabolismo energético es clave para la sobrevivencia del camarón durante las fluctuaciones en el nivel de OD.

Durante la hipoxia, en *L. vannamei* se ha reportado el aumento en la concentración de glucosa en branquias y músculo, lo que sugiere una estrategia para sustentar la alta demanda de energía para el mantenimiento de la tasa de ventilación y la locomoción, respectivamente. Por otro lado, la disminución de glucógeno en el hepatopáncreas indica que este tejido funciona como reserva. Debido a que el hepatopáncreas es responsable de diversos procesos metabólicos como la degradación, absorción y almacenamiento de nutrientes, es probable que la disminución en glucógeno se deba a la degradación de reservas de glucosa fácilmente movilizables, para satisfacer la demanda de energía en respuesta al estrés (Pérez-Rostro *et al.*, 2004; Ulaje *et al.*, 2019).

2.4. Glucólisis Anaerobia en Respuesta a la Hipoxia

Se reportó que en el camarón, las concentraciones de glucosa en la hemolinfa aumentan durante el estrés hipóxico demostrando que las reservas de glucosa son movilizadas con el fin de proporcionar sustratos para la obtención de energía de diferentes tejidos (Pérez-Rostro *et al.*, 2004; Ulaje *et al.*, 2019). Aunado a esto, en *L. vannamei* se demostró que durante la hipoxia (1.45 mg de O₂/L) hubo

un aumento en la expresión de los transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-2. Cabe mencionar que GLUT-1 es ubicuamente expresado en condiciones de normoxia y predomina en branquias, mientras que GLUT-2 sólo se detectó en hepatopáncreas (Martínez-Quintana *et al.*, 2014, 2015). El aumento de los transportadores de glucosa en respuesta a la hipoxia sucede debido a la necesidad del organismo de movilizar la glucosa para satisfacer las demandas de los distintos órganos. Por otra parte, en músculo y branquias, la hipoxia induce la acumulación de lactato (glucólisis anaerobia) que después es transportado por la hemolinfa a la glándula digestiva o hepatopáncreas, donde es utilizado como sustrato gluconeogénico para la generación de glucosa *de novo*. Después, la glucosa regresa a otros tejidos o es metabolizada en el hepatopáncreas (Racotta *et al.*, 2002; Ulaje *et al.*, 2019).

Por otro lado, se reportó un aumento en los transcritos de PFK en el camarón durante el estrés por hipoxia, sugiriendo que la enzima aumenta su actividad para hacer frente a la demanda de degradación de glucosa acelerando la producción de ATP (Cota-Ruiz *et al.*, 2015). También se ha reportado el aumento en la expresión de LDH1 y LDH2. Es importante mencionar que el cambio en la expresión de la LDH es considerado un marcador para seguir el cambio de la glucólisis aerobia a anaerobia (Soñanez-Organis *et al.*, 2012; Ulaje *et al.*, 2019), ya que esta enzima cataliza la síntesis de lactato a partir de piruvato en células donde la disponibilidad de oxígeno es limitada (Stryer *et al.*, 2013). Por otra parte, se ha observado una respuesta similar en la expresión de la HK en branquias en el camarón en respuesta a bajas concentraciones de OD, indicando que la activación y/o aumento en la glucólisis anaerobia es provocada por este estresor (Soñanez-Organis *et al.*, 2011). Lo anterior sugiere que hay una aceleración en la glucólisis anaerobia incrementando así la movilización de glucosa en el camarón.

Estos mecanismos de respuesta a la hipoxia exponen la importancia de la expresión de las enzimas glucolíticas y gluconeogénicas de manera tejido-específica. Los diferentes tejidos tienen funciones particulares en la respuesta al estrés, por lo que es posible suponer la existencia de isoformas de estas enzimas, con niveles de expresión y actividad específicos. Las respuestas de regulación del metabolismo energético forman parte de la estrategia para el uso de la energía por el camarón para contrarrestar al estrés por hipoxia. En el cultivo de camarón, estos resultados implican que el camarón está preparado para responder a los bajos niveles de OD de los estanques. Sin embargo, la exposición a condiciones de estrés compromete el crecimiento del camarón.

2.4.1. Primer Punto de Control en la Glucólisis: Hexocinasa

La glucólisis es una vía metabólica central en los organismos donde se oxida a la glucosa para generar energía en forma de ATP e intermediarios para usarse en otras rutas metabólicas. La glucólisis sucede en el citoplasma de la célula donde una molécula de glucosa es oxidada para generar dos moléculas de piruvato. La glucólisis puede ocurrir en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, ya que el destino del piruvato depende de la presencia o ausencia de oxígeno en las células. La oxidación completa de la glucosa en condiciones aeróbicas, incluyendo el ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa, da como resultado 32 moles de ATP por mol de glucosa (Fig. 2). Sin embargo, en condiciones anaeróbicas, solo se pueden producir 2 moles de ATP (Stryer *et al.*, 2013). Esto es significativo para la célula desde el punto de vista energético, ya que la condición de oxígeno determina cuántos ATP se obtiene durante la oxidación de glucosa.

Tanto en la glucólisis aerobia como en la anaerobia, las reacciones catalizadas por las enzimas HK, PFK y PK son irreversibles, por lo que son puntos clave en la regulación de la vía (Fig. 3). Cada una de estas reacciones sirve como un punto de control, ya que las actividades enzimáticas están reguladas por efectores alostéricos o modificaciones covalentes (Stryer *et al.*, 2013). Además, como se ha mencionado anteriormente, la expresión de estas enzimas varía en función de la regulación en la transcripción, que tiene cambios con el fin de satisfacer las necesidades metabólicas de la célula ante una situación dada (Hantzidiamantis y Lappin, 2021; Melkonian y Schury, 2021). Siendo la HK la primera enzima de esta ruta metabólica, su caracterización en los distintos niveles moleculares es de interés en todos los organismos, así como los cambios en su expresión y actividad debidos a factores de estrés que comprometan el correcto funcionamiento del metabolismo.

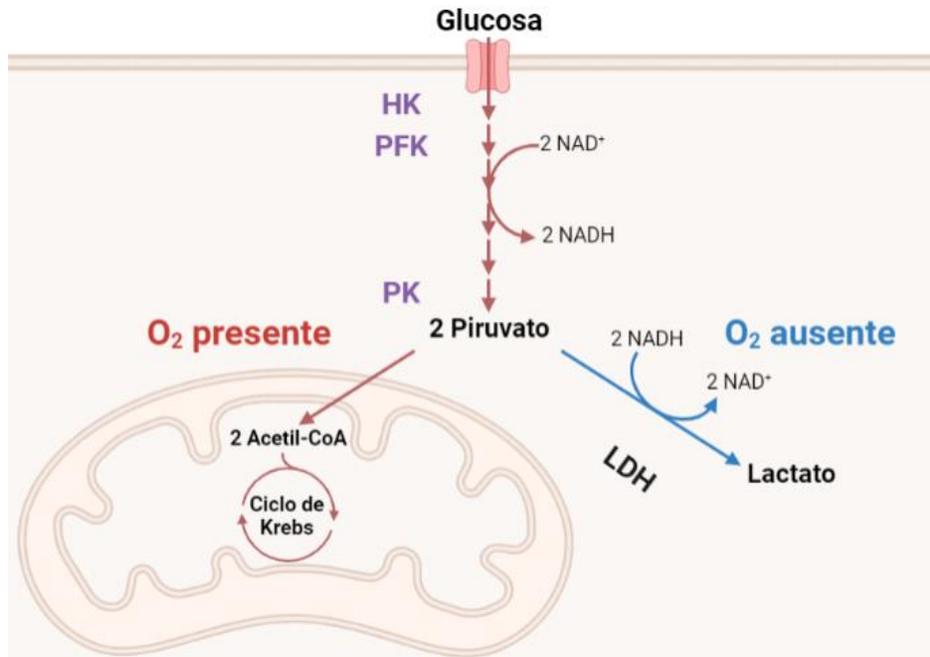


Figura 2. Glucólisis: destino del piruvato en presencia o ausencia de oxígeno. Las enzimas que catalizan las reacciones irreversibles se muestran en color morado. Stryer *et al.*, 2013.

La primera reacción de la glucólisis ocurre cuando una molécula de glucosa entra a la célula y es inmediatamente fosforilada por la HK obteniendo glucosa-6-fosfato (G-6-P) como producto, mediante la hidrólisis de ATP. Por su parte, la G-6-P tiene múltiples destinos metabólicos (Fig. 3): puede catabolizarse mediante la glucólisis y el ciclo de Krebs para satisfacer las necesidades energéticas del organismo. También en ciertos tejidos y órganos como el hígado, la G-6-P puede oxidarse a través de la vía de las pentosas fosfato para proporcionar precursores de azúcar fosfato y NADPH para diversas vías biosintéticas, también se puede convertir en uridina difosfato (UDP)-glucosa para la polimerización de glucógeno, la principal forma de almacenamiento de carbohidratos (CHOs) en la fisiología animal, y es precursor de la vía biosintética de las hexosaminas (Rajas *et al.*, 2019). La HK es clave para el metabolismo ya que es responsable de la producción de G-6-P, que representa un punto de ramificación para procesos anabólicos y catabólicos.

La glucosa entra a la célula a través de proteínas de transporte específicas, como GLUT-1. Este paso es importante porque la G-6-P no puede difundirse a través de la membrana por sus cargas negativas, evitando que salga de la célula, facilitando así su catabolismo adicional. Se ha descrito que la HK tiene una amplia especificidad y es capaz de fosforilar hexosas. La HK es inhibida por

altas concentraciones de su producto, G-6-P, lo que sirve como señal para indicar que la glucosa ya no es requerida para la obtención de energía (Irwin y Tan, 2008; Stryer *et al.*, 2013).

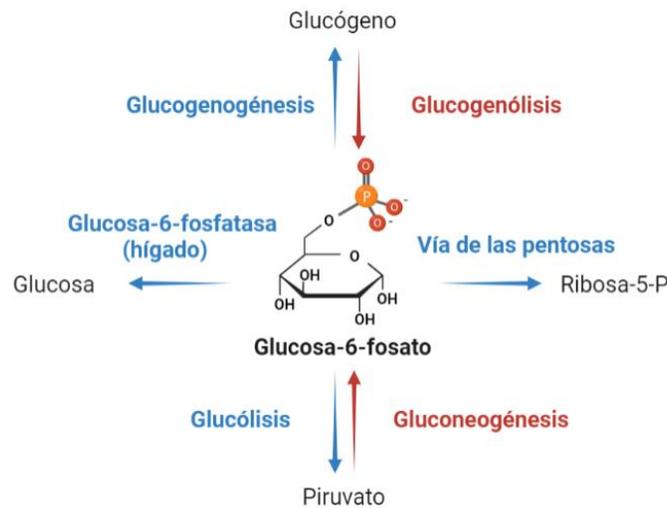


Figura 3. Destinos metabólicos de la glucosa-6-fosfato (G-6-P). Rajas *et al.*, 2019.

En una misma especie pueden expresarse varias isoformas de la HK con diferentes actividades catalíticas y propiedades reguladoras. En mamíferos, la isoforma HK-IV, también denominada glucocinasa (GCK), tiene como sustrato específico a la glucosa. Tanto la HK-IV como las otras isoformas de la HK realizan la misma función de fosforilar la glucosa en G-6-P y atraparla en la célula, la diferencia entre los dos radica en su ubicación y afinidad por la glucosa. La HK-IV está presente en el hígado y en las células β del páncreas, mientras que el resto de las isoformas de la HK están presentes en diversos tejidos. La HK-IV tiene una afinidad mucho menor por la glucosa y funciona sólo cuando los niveles de glucosa son altos. Cuando aumentan los niveles de glucosa en sangre, la HK-IV dirige la síntesis y el almacenamiento de glucógeno en el hígado. Por el contrario, cuando los niveles de glucosa son bajos, las otras HKs con mayor afinidad por glucosa, inician la glucólisis en las células que necesitan energía (Cárdenas *et al.*, 1998; Matschinsky & Wilson, 2019). Esto demuestra que la existencia de isoformas de la HK es necesaria para la regulación del metabolismo energético en un mismo organismo.

Por otra parte, se sabe que la glucosa es el sustrato preferido para las HKs, pero también pueden fosforilar otras hexosas. Sólo unas pocas especies, especialmente en organismos procariontas, tienen

verdaderas glucocinasas (ATP:D-glucosa-6-fosfotransferasa EC 2.7.1.2), que son enzimas específicas para glucosa y no puede fosforilar otras hexosas, o contienen HKs que sólo actúan sobre una hexosa en específico. Pero otras especies como los animales presentan HKs con baja especificidad de fosforilación de hexosas, es decir, pueden actuar sobre glucosa, manosa o fructosa (Wilson, 1995). En la rata *Rattus norvegicus*, uno de los organismos más estudiados, las cuatro isoenzimas de la HK tienen esencialmente la misma especificidad para la glucosa y la fructosa (Cárdenas *et al.*, 1998).

Otro punto importante en las características de las HKs es la regulación de su actividad mediante modificaciones postraduccionales. Por ejemplo, la fosforilación reversible actúa como un control de encendido y apagado (activación y desactivación), y por ende, regula los cambios en el flujo metabólico mediante diferentes vías al mediar el cambio en el estado de actividad de las enzimas (Derouiche *et al.*, 2012). Uno de los mecanismos adaptativos de regulación de la HK en respuesta al estrés ambiental en diversos organismos es la fosforilación reversible (Dieni & Storey, 2011). Las proteínas cinasas PKA (proteína cinasa dependiente de AMPc) y PKC (proteína cinasa C que fosforila específicamente residuos de serina/treonina) (Lim *et al.*, 2015; Taylor *et al.*, 2004) fueron identificadas como las enzimas responsables de la posible fosforilación de las isoformas de la HK del camarón. Se ha reportado que estas proteínas cinasas fosforilan a la HK en diversos organismos como forma de regulación enzimática (Abnous & Storey, 2008; Childers & Storey, 2016; Dawson & Storey, 2012; Dieni & Storey, 2011; Holden & Storey, 1997; Lama *et al.*, 2013). En condiciones de estrés, el organismo debe producir cambios en distintos niveles metabólicos para dar respuesta a las nuevas necesidades, como la depresión o inducción de la tasa metabólica. En este sentido, la fosforilación reversible representa un punto de control esencial a nivel postraduccionales de las enzimas para la regulación del metabolismo.

2.4.2. Isoformas de la Hexocinasa en Vertebrados e Invertebrados

En vertebrados se han identificado y estudiado cinco tipos de HKs conocidas como HK-I, II, III y IV o GCK (Cárdenas *et al.*, 1998; Wilson, 1995). La quinta secuencia génica de HK fue identificada más recientemente por Irwin y Tan (2008), adyacente al gen que codifica a la isoforma HK-I, en el

cromosoma 10. Este gen fue nombrado HKDC1 dentro de la base de datos del genoma. Los genes HK-I y HKDC1 están organizados de forma cabeza-cola sugiriendo que son el producto de un evento de duplicación génica en tándem. Además, la búsqueda en la base de datos del NCBI de etiquetas de secuencias transcritas (EST) indica que HKDC1 se expresa en humano en tejidos de faringe, timo, colon, esófago y ojo, y debido a que su secuencia codifica un marco abierto de lectura de 917 aminoácidos. En 2018, Khan et al. demostraron que HKDC1 es altamente expresada en humano en intestino, páncreas y pulmón.

Como se mencionó anteriormente, las isoformas de la HK tienen diferentes roles en el metabolismo de la glucosa basados en sus propiedades y patrones de expresión. Por ejemplo, en vertebrados, la HK-I es una enzima activa expresada ubicuamente, principalmente en cerebro y riñón, y tiene un papel en la función generalizada del catabolismo de la glucosa para la generación de energía. La isoforma HK-II es la principal isoforma presente en músculo y tejido adiposo, mientras que la isoforma III predomina en bazo y linfocitos. En contraste, la isoforma IV es expresada en tejidos sensibles a los niveles de glucosa como las células β del páncreas, y tiene un papel importante en la detección de glucosa en el organismo. A pesar de que estas isoformas provienen de un ancestro común y tienen una función conservada en fosforilar glucosa, difieren en sus propiedades cinéticas, localización y patrón de expresión tisular. Por lo que, la expresión específica de las isoformas en los diferentes tejidos se correlaciona con su rol en determinar el patrón de utilización de glucosa en el metabolismo de mamíferos (Cárdenas *et al.*, 1998; Wilson, 2003).

El alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de las HKs de vertebrados demuestra que las isoformas están altamente conservadas entre todas las especies estudiadas. Además, el análisis filogenético de las secuencias de los genes de HK confirmó la relación entre las especies, indicando que son secuencias ortólogas. Debido a que los genes de la HK de invertebrados contienen solo un dominio, se puede inferir que el gen de vertebrados ancestrales también contenía un único dominio. La duplicación de genes de la HK a través de duplicaciones del genoma podría explicar su presencia en todas las especies de vertebrados y su distribución en cuatro cromosomas diferentes. Se cree que el evento de duplicación del dominio HK, para dar lugar a las enzimas de 100 kDa, ocurrió después del evento de divergencia entre urocordados y vertebrados (Irwin y Tan, 2008).

Por otra parte, las HKs de invertebrados han sido menos estudiadas en comparación con las enzimas de vertebrados. En la mosca de la fruta *D. melanogaster* se reportaron dos secuencias codificantes de la HK de aproximadamente 45 kDa cada una, con dominios conservados con respecto a las HKs

de mamíferos, y se encontró la expresión diferencial por tejido y por etapa de desarrollo (Jayakumar *et al.*, 2001). Cao *et al.*, (2019) investigaron la expresión de algunas enzimas glucolíticas como biomarcadores de toxicidad en la ostra del Pacífico *Crassostrea gigas*, y reportaron un aumento en la expresión de la HK cuando el organismo está expuesto a bajos niveles de pH y a iones metálicos como el cobre. Además, diversos estudios han realizado análisis filogenéticos utilizando las secuencias nucleotídicas o EST de invertebrados de HK como en los insectos *Apis mellifera*, *Culex quinquefasciatus*, *Glossina morsitans morsitans*, *Locusta migratoria*, *Drosophila simulans*, *Aedes aegypti*, entre otras (Soñanez-Organis *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2017). Sin embargo, hay muy pocos reportes donde estas hayan sido caracterizadas y estudiadas a fondo. En su mayoría, sólo se reporta la secuencia de la enzima, pero no se han realizado estudios sobre su expresión por tejido o en diferentes estados del desarrollo, ni se han descrito sus propiedades cinéticas. Como se ha visto en mamíferos, puede haber variaciones en la expresión y actividad de la HK debido a la presencia de isoformas que regulen al metabolismo energético según la condición en la que se encuentre el organismo (Wilson, 2003).

Los estudios de la HK en crustáceos son aún más escasos comparados con otros organismos. En el cangrejo de estuario *Neohelice granulata* se reportó un cambio significativo en la actividad de la HK en branquias cuando se expuso a diferentes concentraciones subletales de cobre (Lauer *et al.*, 2012). En el camarón *M. nipponense* se caracterizó la secuencia codificante de la HK y se evaluó su expresión bajo condiciones hipóxicas, y se reportó que en normoxia, la HK se expresó constitutivamente en corazón, branquias, músculo, hepatopáncreas e intestino, con una mayor expresión en los últimos dos tejidos (Sun *et al.*, 2017).

Soñanez-Organis *et al.*, (2011) clonaron y caracterizaron una secuencia codificante de la HK en *L. vannamei* de aproximadamente 50 kDa. Además de la caracterización de la secuencia codificante de la HK, también se reportaron los cambios en la expresión y actividad de la HK en respuesta a la hipoxia. Como resultados se reportó que la hipoxia (1.5 mg de O₂/L) indujo el aumento en la expresión y actividad de la HK en branquias durante la primera hora, seguido de una disminución cercana a los niveles de normoxia cumplidas las 24 horas de exposición. Sin embargo, en músculo se encontró una escasa correlación entre la expresión y la actividad de HK, ya que en este tejido la expresión disminuyó a medida que se prolongó el tiempo de hipoxia pero la actividad fue en aumento. Lo anterior, sugiere la presencia de isoformas de la HK en *L. vannamei*, aunado a lo que se ha encontrado en otras especies donde existen isoformas de la HK con distribuciones tisulares específicas.

Aún son muy pocos los estudios que proporcionan información relevante sobre los cambios en el metabolismo energético de crustáceos en hipoxia, por lo que existe la necesidad de continuar con las investigaciones para dilucidar la expresión diferencial de las isoformas de enzimas glucolíticas, como la HK, de estas especies. Por lo tanto, surgen las siguientes preguntas de investigación: ¿cuántas isoformas de la HK existen en el camarón blanco *L. vannamei*? y ¿cómo es la expresión de las isoformas de la HK de *L. vannamei* en los diferentes tejidos en condiciones de normoxia, hipoxia y reoxigenación? Debido a lo que se ha reportado para otras especies donde las isoformas de la HK tienen un papel específico en la regulación del metabolismo de la glucosa y su expresión es diferencial en cada tejido, es fundamental caracterizar a las posibles isoformas de esta enzima en el camarón blanco. Además, se ha visto que el patrón de expresión y actividad de la HK en especies tanto de vertebrados como invertebrados es afectado por condiciones de estrés como la hipoxia. La expresión de las isoformas de la HK cuando el camarón es expuesto a bajas concentraciones de OD seguidos de reoxigenación no ha sido evaluada, a pesar de que dichas condiciones son comunes en cultivo e incluso en donde habitan naturalmente. Para contribuir al conocimiento y elucidar las respuestas moleculares frente a la hipoxia en los diferentes tejidos de *L. vannamei*, es esencial la caracterización de las posibles isoformas de la HK, así como la evaluación de su expresión debido a su relevancia en la adaptación al estrés hipóxico.

3. HIPÓTESIS

En el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* existen al menos dos isoformas de la hexocinasa y su expresión es afectada por condiciones de hipoxia y reoxigenación de manera tejido-específica.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Caracterizar las secuencias codificantes de las isoformas de la hexocinasa del camarón blanco *L. vannamei* y evaluar el efecto de la hipoxia y la reoxigenación sobre su expresión génica en branquias y hepatopáncreas.

4.2. Objetivos Específicos

1. Analizar el genoma y el transcriptoma del camarón blanco *L. vannamei* en la búsqueda de isoformas anotadas de la hexocinasa.
2. Obtener las secuencias nucleotídicas codificantes de las isoformas de la hexocinasa mediante clonación y secuenciación y caracterizar sus secuencias deducidas de aminoácidos.
3. Predecir la estructura tridimensional de las isoformas de la hexocinasa de *L. vannamei* mediante modelación por homología.
4. Evaluar la expresión relativa de las isoformas de la hexocinasa en branquias, hepatopáncreas y músculo de camarones en condiciones normales de oxígeno.
5. Determinar el efecto de la hipoxia y la reoxigenación en la expresión relativa de las isoformas de la hexocinasa en branquias y hepatopáncreas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Análisis del Genoma y del Transcriptoma de *L. vannamei* en la Búsqueda de Isoformas Anotadas de la Hexocinasa

Se realizó la búsqueda de secuencias de la HK anotadas en el genoma (Zhang *et al.*, 2019) y en el transcriptoma (Ghaffari *et al.*, 2014) del camarón *L. vannamei* utilizando la herramienta en línea BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para determinar la estructura de las variantes de transcrito de la HK-2 identificadas en el genoma del camarón se analizó el gen de la HK-2 (LOC113805141) (BioProject: PRJNA508983) en el software Unipro UGene V.33. Además, se utilizó el programa Patch 1.0 (geneXplain GmbH, Alemania; <http://gene-regulation.com/pub/programs.html>) para identificar posibles elementos de respuesta a hipoxia (HRE) presentes en la región promotora del gen.

5.2. Caracterización Molecular de las Isoformas de la Hexocinasa

5.2.1. Diseño de Oligonucleótidos

Con base en los análisis del genoma y del transcriptoma de *L. vannamei* en la búsqueda de secuencias anotadas de la HK, se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar las secuencias codificantes completas de las isoformas de la HK mediante PCR. También se diseñaron oligonucleótidos para evaluar la expresión relativa de las isoformas de la HK por RT-qPCR. Las propiedades de los oligonucleótidos (longitud 18-24 pb, T_m 55-60 °C, contenido GC 40-60%, autocomplementariedad y formación de estructuras secundarias) fueron evaluadas en el programa OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>).

5.2.2. Amplificación y Clonación

Se amplificaron mediante PCR las secuencias codificantes completas de las isoformas de la HK usando como templado DNA complementario (cDNA) de branquias y hepatopáncreas de camarones en normoxia. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 25 μ L conteniendo 12.5 μ L de HotStart PCR Master Mix 2X (New England BioLabs), 0.6 mM de cada oligonucleótido (sentido y antisentido) y 2 μ L de cDNA (correspondientes a 50 ng de RNA total). Las condiciones de la PCR fueron 95 °C por 3 min (1 ciclo); 95 °C por 30 s, 57.5 °C por 30 s, 72 °C por 2 min (35 ciclos) y 72 °C por 10 min (1 ciclo). Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Los productos de PCR fueron ligados en vectores plasmídicos que se usaron para transformar células de *Escherichia coli* utilizando el sistema de clonación pGEM-T easy System I (Promega). Cada reacción de ligación se realizó en un volumen de 5 μ L conteniendo 2.5 μ L de buffer de ligación, 0.5 μ L del vector pGEM-T easy, 1.5 μ L del producto de PCR y 0.4 μ L de la enzima ligasa T4. Se realizó la transformación de células *E. coli* TOP10 químicamente competentes con 2 μ L de la reacción de ligación mediante choque térmico. Las bacterias transformadas se sembraron en medio Luria-Bertani (LB) y se seleccionaron colonias resistentes a ampicilina que potencialmente presentaron el plásmido recombinante identificadas por su coloración blanca. La presencia del inserto en las colonias seleccionadas fue confirmada mediante PCR con las mismas condiciones utilizadas para la amplificación y usando los oligonucleótidos específicos para cada gen. Los productos se analizaron mediante electroforesis.

Se realizaron extracciones rápidas de DNA plasmídico (DNAP) de tres colonias por cada inserto. Para esto, se cultivó cada colonia durante 18 h a 37 °C con agitación de 200 rpm en 5 mL de medio LB líquido con ampicilina (100 μ g/mL). Por duplicado, se centrifugaron 1.5 mL de cada cultivo por 5 min a 12,000 g para obtener un pellet de bacterias, se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 250 μ L de solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0). Las células fueron sometidas a lisis alcalina agregando 250 μ L de solución II (SDS 1%, NaOH 0.2 N) preparada en el momento e incubando por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 250 μ L de solución III fría (K^+ 3 M, acetato 5 M) y se incubó en hielo durante 15 min. Enseguida se centrifugó por 10 min a 12,000 g y se pasó el sobrenadante a otro tubo al que se le

añadieron 700 μL de isopropanol, se centrifugó de nuevo por 30 min a 12,000 g y se descartó el sobrenadante. El pellet resultante se lavó dos veces añadiendo 500 μL de etanol 70% en cada lavado, centrifugando por 5 min a 12,000 g y descartando el etanol sobrenadante después de cada lavado. El etanol remanente se evaporó al vacío centrifugando a $\sim 40^\circ\text{C}$ en el concentrador de vacío SpeedVac DNA 100 (Savant) por 10 min. El pellet obtenido se resuspendió en 50 μL de buffer TE con RNasa A (10 ng/ μL) y se incubó en baño de agua a 42°C por 10 min. La presencia y tamaño de los insertos se confirmó con la digestión del DNAp con la enzima de restricción EcoRI (Fermentas). La digestión se llevó a cabo en un volumen final de 20 μL conteniendo 2 μL de buffer EcoRI 10X, 1 μL de la enzima de restricción EcoRI y 0.5 μg de DNAp, durante 1 h a 37°C . Luego, el DNAp fue purificado mediante la extracción con solventes orgánicos utilizando 1 volumen de fenol equilibrado (pH 7.9) y un volumen de 1-bromo-3-cloropropano, se centrifugó por 5 min a 13,000 g, se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio con 0.1 volúmenes de acetato de sodio (3M, pH 5.2) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, se mezcló por inmersión y se incubó durante 10 min a -20°C . Después se centrifugó la mezcla por 15 min a 12,000 g, se lavó con 1 mL de etanol al 70% y se volvió a centrifugar por 10 min. Se decantó el etanol remanente y se secó el pellet al vacío. El pellet se resuspendió en 40 μL de buffer TE. El DNAp purificado fue enviado a secuenciar al Laboratorio de Servicios Genómicos LABSERGEN-LANGEBIO (Irapuato, Guanajuato, México).

5.3. Análisis Bioinformáticos de las Secuencias de las Isoformas de la Hexocinasa

5.3.1. Dedución y Análisis de las Secuencias Aminoacídicas de las Isoformas de la Hexocinasa

El análisis de cromatogramas de las secuencias nucleotídicas y la obtención de la secuencia deducida de aminoácidos se realizaron con el programa SnapGene 3.1.4 (GSL Biotech, LLC) y Sequence Manipulation Suite 2.0 (<http://www.bioinformatics.org/sms2/index.html>). El peso molecular estimado y el punto isoelectrico teórico de cada proteína deducida se calcularon con el

programa ProtParam (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam>). Se utilizaron las plataformas Pfam (<http://pfam.xfam.org/>), InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) y NCBI Conserved Domains (<https://www.ncbi.nih.gov/Structure.cgi>) para identificar dominios conservados y motivos característicos de HKs. Los posibles sitios de fosforilación en las secuencias se identificaron con la herramienta en línea NetPhos 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>).

5.3.2. Alineamiento Múltiple de Secuencias

Se realizó una búsqueda en la herramienta en línea BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para identificar secuencias de aminoácidos homólogas a cada isoforma de la HK de diferentes especies disponibles en la base de datos de NCBI (Cuadro 1). Las secuencias aminoacídicas obtenidas, junto con las secuencias deducidas de las HKs de *L. vannamei* se compararon entre sí mediante alineamiento múltiple de secuencias utilizando la versión en línea de Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Los alineamientos múltiples se editaron en el programa en línea ESPript 3.0 (<https://esript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>).

5.3.3. Análisis Filogenético

Se utilizaron secuencias de aminoácidos de la HK de diversas especies (Cuadro 1) para la construcción de un árbol filogenético con el software MEGA 10 empleando el método de máxima verosimilitud y el modelo Jones-Taylor-Thornton para la sustitución de aminoácidos. Cada rama del árbol fue determinada a partir de 1000 réplicas de bootstrap. Las secuencias de HK de *Deltaproteobacteria bacterium*, *Candidatus Omnitrphica bacterium* y *E. coli* se utilizaron para enraizar los árboles construidos.

Cuadro 1. Secuencias aminoacídicas de isoformas de la HK de diversas especies utilizadas en el alineamiento múltiple* y/o análisis filogenético.

Secuencias HK tipo 1		Secuencias HK tipo 2	
Nombre científico	No. GenBank	Nombre científico	No. GenBank
<i>Penaeus monodon</i> *	XP_037782552.1	<i>Penaeus monodon</i> *	XP_037776117.1
<i>Penaeus japonicus</i> *	XP_042890745.1	<i>Penaeus japonicus</i> *	XP_042862107.1
<i>Homarus americanus</i> *	XP_042211219.1	<i>Homarus americanus</i> *	XP_042212278.1
<i>Pollicipes pollicipes</i> *	XP_037083762.1	<i>Macrobrachium nipponense</i> *	ASJ77422.1
<i>Limulus polyphemus</i> *	XP_013776015.1	<i>Portunus trituberculatus</i> *	MPC12833.1
<i>Zootermopsis nevadensis</i> *	XP_035734406.1	<i>Maylandia zebra</i> *	XP_004556900.2
<i>Vespa mandarinia</i> *	XP_020706631.1	<i>Aedes aegypti</i> *	XP_011493158.1
<i>Apis mellifera</i> *	XP_016767150.1	<i>Chionoecetes opilio</i> *	KAG0722174.1
<i>Amphibalanus amphitrite</i> *	KAF0291251.1	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	XP_021477603.2
<i>Orussus abietinus</i>	XP_012276575.1	<i>Hyalella azteca</i>	XP_018013710.1
<i>Athalia rosae</i>	XP_021920962.1	<i>Amphibalanus amphitrite</i>	XP_043209946.1
<i>Homo sapiens</i>	NP_000179.2	<i>Pollicipes pollicipes</i>	XP_037094690.1
<i>Pan paniscus</i>	XP_008967167.1	<i>Aquila chrysaetos</i>	XP_029890597.1
<i>Trachypithecus francoisi</i>	XP_033065576.1	<i>Bufo bufo</i>	XP_040270351.1
<i>Macaca mulatta</i>	XP_015002976.2	<i>Marmota monax</i>	KAF7478625.1
<i>Cebus imitator</i>	XP_017404410.1	<i>Numida meleagris</i>	XP_021230689.1
<i>Pan troglodytes</i>	XP_016773955.1	<i>Falco peregrinus</i>	XP_027637978.1
<i>Gorilla gorilla</i>	XP_030870998.1	<i>Rana temporaria</i>	XP_040201782.1
<i>Mirounga leonina</i>	XP_034872507.1	<i>Castor canadensis</i>	XP_020037415.1
<i>Castor canadensis</i>	XP_020017566.1	<i>Homo sapiens</i>	CAA86476.2
<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	XP_011232564.2	<i>Pan troglodytes</i>	XP_001162535.3
<i>Mus musculus</i>	NP_001139572.1	<i>Macaca mulatta</i>	XP_001111706.1
<i>Rattus norvegicus</i>	NP_036866.2	<i>Rattus norvegicus</i>	NP_036867.1
<i>Bos taurus</i>	DAA14212.1	<i>Escherichia coli</i>	MSL57368.1
Secuencias HK tipo 1			
Nombre científico	No. GenBank	Nombre científico	No. GenBank
<i>Gadus morhua</i>	XP_030207574.1	<i>Cyprinus carpio</i>	XP_042592786.1
<i>Siniperca chuatsi</i>	XP_044044809.1	<i>Deltaproteobacteria bacterium</i>	MBN2687463.1
<i>Cheilinus undulatus</i>	XP_041641698.1	<i>Candidatus Omnitrophica bacterium</i>	NQU94606.1
<i>Danio rerio</i>	AAH67330.1		

5.3.4. Modelación por Homología de la Estructura Tridimensional de las Isoformas de la Hexocinasa

Las estructuras terciarias de las isoformas de la HK de *L. vannamei* se determinaron mediante modelación por homología con el software en línea SWISS-Model (<https://swissmodel.expasy.org>). El modelo fue refinado mediante la minimización de energía y validado con gráficos de Ramachandran. Se utilizaron como templado las estructuras cristalográficas de la HK-1 (1.90 Å) y HK-2 (2.45 Å) de *Homo sapiens*, que fueron seleccionadas alineando las secuencias deducidas de las isoformas de la HK de *L. vannamei* con las estructuras depositadas en la base de datos del Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>) y estas fueron las elegidas debido a que presentaron la mayor identidad de secuencia. La visualización de los modelos tridimensionales se realizó con el software PyMOL Molecular Graphics System 2.0.7 (Schrödinger, LLC).

5.4. Bioensayo de Hipoxia e Hipoxia con Reoxigenación

Se realizó un bioensayo con camarones juveniles en el Laboratorio de Fisiología de Invertebrados Marinos en CIAD. Los camarones fueron alimentados 3 veces al día con una dieta comercial (35% de proteína) correspondiente al 3% de su peso. Se seleccionaron 105 organismos sanos con un peso promedio de 12.84 ± 1.39 g y se distribuyeron aleatoriamente en 7 tanques independientes (15 camarones/tanque). Previo al bioensayo, los camarones fueron aclimatados por 24 horas en tanques de 35 L con aireación constante (5.0 mg de O₂/L, 28 °C, salinidad 35 ppm). Los tratamientos fueron normoxia (5.79 ± 0.45 mg de O₂/L), hipoxia (1.10 ± 0.08 mg de O₂/L) e hipoxia seguido de una hora de reoxigenación (1.11 ± 0.10 mg de O₂/L; 5.03 ± 0.46 mg de O₂/L). La condición de normoxia fue mantenida mediante aireación constante utilizando piedras difusoras. En los tratamientos de hipoxia, se bajó el OD gradualmente al bombear nitrógeno en los estanques. Para la reoxigenación, pasado el tiempo establecido de hipoxia, se aumentó la concentración de oxígeno bombeando aire hasta alcanzar los 5 mg de O₂/L. Cada hora se monitoreó la temperatura y el OD de los tanques

utilizando un oxímetro portable (YSI proODO, Yellow Spring, OH, EUA) para mantener las condiciones de cada tratamiento.

Se muestrearon los camarones de cada tratamiento a las 0, 6 y 12 h. Para los tratamientos con reoxigenación, se muestreó 1 h después de que se restableció la normoxia. En cada muestreo se obtuvieron tejidos de branquias, hepatopáncreas y músculo de cada camarón y se colocaron aproximadamente 50 mg de tejido en microtubos conteniendo 500 μ L de TRI Reagent (Sigma-Aldrich) y se almacenaron a -80°C hasta la extracción del RNA total.

5.5. Evaluación de la Expresión Relativa de Isoformas de la Hexocinasa

5.5.1. Extracción de RNA Total y Síntesis de cDNA

Las muestras de branquias y músculo almacenados en TRI Reagent a -80°C se descongelaron en hielo para posteriormente homogenizarlas con el sonicador ultrasónico Sonifier 250 (Branson, EUA). El tejido de hepatopáncreas se homogenizó con pistilos estériles utilizando el homogenizador Kontes. Después, el homogenizado se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4°C para eliminar el material insoluble, se transfirió el sobrenadante en un tubo limpio y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 50 μ L de 1-bromo-3-cloropropano, se agitó vigorosamente y se dejó reposar por 15 min. Posteriormente, se centrifugó el homogenizado a 12,000 g por 15 min a 4°C . Se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio, se agregaron 250 μ L de isopropanol y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente. El homogenizado se centrifugó nuevamente a 12,000 g por 10 min a 4°C , se removió el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 mL de etanol al 75%, se centrifugó a 7,600 g por 5 min. Se decantó el etanol y se secó el pellet en el concentrador de vacío SpeedVac DNA 100 (Savant). El pellet se resuspendió en agua libre de nucleasas, se cuantificó el RNA total mediante la absorbancia a 260 nm y se determinó su pureza mediante la relación A_{260}/A_{280} en el espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific). El RNA total se trató con DNAsa I (Roche, Mannheim, Alemania) para la eliminación de DNA genómico (DNAg) residual. Se confirmó la integridad del RNA extraído mediante electroforesis

en gel de agarosa al 1.5% y se evaluó la descontaminación de DNAg por qPCR utilizando los oligonucleótidos específicos para la piruvato carboxilasa (PCF5/PCR5) que amplifican un fragmento de 134 pb (Cuadro 3), las condiciones de reacción y amplificación se realizaron como reportaron Granillo-Luna et al. (2022). Se sintetizó el cDNA por duplicado a partir de RNA total de hepatopáncreas, branquias y músculo de camarones. La síntesis se llevó a cabo mediante la reacción de transcripción reversa (RT) utilizando el kit Quantitec Reverse Transcription (QIAGEN, Valencia, CA, EUA) en un volumen final de 10 μ L, utilizando 500 ng de RNA total, 2 μ L de buffer RT QuantiScript 5X, 0.5 μ L RT primer mix y 0.5 μ L de la enzima RT QuantiScript. Las reacciones se incubaron a 42 °C por 30 min seguido de la inactivación de la enzima a 95 °C por 3 min. El volumen final de los cDNAs fue ajustado a una concentración de 25 ng/ μ L equivalentes al RNA total, agregando 10 μ L de agua libre de RNasas.

5.5.2. Cuantificación de la Expresión Relativa por RT-qPCR

Se evaluó la expresión de las isoformas de la HK relativa al gen de referencia que codifica a la proteína ribosomal L8 de *L. vannamei* utilizando oligonucleótidos específicos en cada caso (Cuadro 3). Para optimizar las condiciones de amplificación para cada gen se realizaron curvas estándar utilizando diluciones seriadas 1:5 de cDNA a partir de 5.0×10^1 a 8.0×10^{-2} ng/ μ L ($R^2 \geq 0.974$). La eficiencia de amplificación se consideró aceptable en un intervalo de 90 a 110%. Se utilizó el termociclador Real-Time PCR Detection System CFX96 Touch (Bio-Rad), con medición de fluorescencia en la extensión. La expresión de la HK-1 se determinó amplificando un fragmento de 294 pb utilizando 350 nM de cada oligonucleótido (HK1F3/HKLvanR) (Cuadro 3). Para la expresión de la HK-2 se amplificó un fragmento de 181 pb con 325 nM de cada oligonucleótido (HK2Fw3/HK2Rv1) (Cuadro 3). Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 15 μ L, conteniendo 7.5 μ L de 2X Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) y 1 μ L de cDNA (correspondiente a 25 ng de RNA total). Las condiciones de amplificación fueron 95 °C por 5 min (1 ciclo); 95 °C por 30 s, 59 °C por 35 s, 72 °C por 55 s (40 ciclos). Las reacciones se realizaron por duplicado para cada cDNA, incluyendo controles negativos sin cDNA como templado y la curva estándar en cada corrida como control positivo.

Para determinar la especificidad de las reacciones se generó una curva de disociación como paso final, donde la fluorescencia se detectó con incrementos de 0.5 °C cada 5 s de 65 a 95 °C. Los resultados se reportaron como expresión relativa HK/L8 y la expresión fue calculada utilizando el método $2^{-\Delta Cq}$, donde Cq se refiere al número de ciclos necesarios para que cada amplificación alcance un umbral en la señal de fluorescencia (Schmittgen y Livak, 2008).

5.6. Análisis Estadístico

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la expresión relativa de las isoformas de la HK del camarón blanco se realizó el análisis estadístico mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías (factores de variación: condición de oxígeno x tiempo), a un nivel de significancia $p < 0.05$. La normalidad de los datos e igualdad de varianzas fueron evaluadas con las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. La comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey-Kramer para determinar las diferencias entre los tratamientos. Debido a que los datos de los tratamientos de hipoxia y reoxigenación no se cumplió la normalidad de los datos e igualdad de varianzas, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, a un nivel de significancia $p < 0.05$. Los análisis se llevaron a cabo en el software NCSS 2021. Los resultados se expresaron como media \pm error estándar de la media (ES) y fueron graficados con el software GraphPad Prism (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Las HKs Anotadas en el Genoma y Transcriptoma de *L. vannamei*

A partir de los análisis de las bases de datos disponibles en el NCBI fue posible identificar las secuencias anotadas de las isoformas de la HK en el genoma (Zhang *et al.*, 2019) y en el transcriptoma (Ghaffari *et al.*, 2014) de *L. vannamei* (Cuadro 2). Se identificó un solo gen de la HK-2 de *L. vannamei* (Gen ID: 113805141) en el GenBank (BioProject: PRJNA508983) del que derivan 3 variantes de transcrito X1-X3 (No. Acceso XM_027356086.1, XM_027356087.1, XM_027356088.1) que codifican a 3 proteínas de diferente tamaño.

Las variantes de transcrito X1-X3 difieren en la composición y longitud de los primeros 4 exones en el extremo 5', pero son idénticas en los últimos 9 exones (Fig. 4). La variante de transcrito X1 está compuesta por los exones 2, 5-13, la variante de transcrito X2 se compone de los exones 1, 5-13, y la variante de transcrito X3 se compone de los exones 3-13. Además, se identificó la secuencia consenso 5'-ACGTG-3' donde se une HIF-1 α a -69 pb corriente arriba del codón de inicio del primer exón del gen. Esto sugiere que HIF-1 podría regular la respuesta transcripcional de la HK-2 durante la hipoxia.

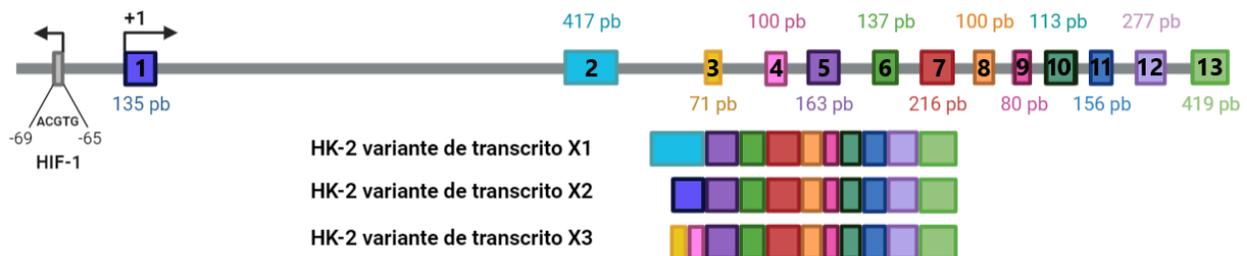


Figura 4. Estructura del gen y de las variantes de transcrito de la HK-2 de *L. vannamei* y ubicación de un sitio de unión de HIF-1 en la región UTR-5'. Los exones se muestran en recuadros de colores.

También se identificaron dos secuencias anotadas como HK-1 (Gen ID: 113825393) y HKDC1 (Gen ID: 113814736) en el genoma del camarón, provenientes de genes distintos. Ambas secuencias alinean parcialmente con una secuencia ubicada en el transcriptoma de Ghaffari et al. (2014), y también alinean con la secuencia de la HK reportada por Soñanez et al. (2011), pero en el genoma no están claramente anotadas, por lo que no fue posible realizar el análisis de exones e intrones.

El análisis de estas secuencias se utilizó como base para el diseño de oligonucleótidos para amplificar por PCR convencional las secuencias codificantes de las isoformas de la HK y evaluar su expresión por RT-qPCR (Cuadro 3). Para la amplificación de las variantes de transcrito X1- X3 de la HK-2 se diseñaron oligonucleótidos sentido específicos debido a que estas secuencias presentan diferencias en el extremo 5' (HK2Fw1, HK2Fw1, HK2Fw3), pero todas comparten el oligonucleótido antisentido (HK2Rv1). Los oligonucleótidos que fueron diseñados para evaluar la expresión génica de la HK-2 fueron HK2Fw4 y HK2Rv1 que alinean en las 3 variantes de transcrito de la HK-2 (producto de 181 pb). Para la amplificación y evaluación de expresión relativa de la HK-1 se utilizaron los oligonucleótidos diseñados por Soñanez et al. (2011), con excepción del oligonucleótido HK1Fw1.

Cuadro 2. Análisis de las secuencias de HK anotadas en el genoma y transcriptoma de *L. vannamei*.

Secuencia	Longitud (pb)	CDS (pb)	Proteína (aa)	No. Acceso	Genoma	Transcriptoma
HK-2 variante de transcrito X1	2078	226-1746	506	XM_027356086.1	Gnomon NW_020868952.1 Gen ID: 113805141 Músculo	Sí se identificó
HK-2 variante de transcrito X2	1795	91 – 1464	457	XM_027356087.1	Gnomon NW_020868952.1 Gen ID: 113805141 Músculo	No se identificó
HK-2 variante de transcrito X3	1830	157 – 1500	447	XM_027356088.1	Gnomon NW_020868952.1 Gen ID: 113805141 Músculo	Sí se identificó
HK-1	830	52-807	251	XM_027378214.1	Gnomon NW_020871341.1 Gen ID: 113825393	Alinea parcialmente
HKDC1	1173	601-867	88	XM_027366793.1	Gnomon NW_020870019.1 Gen ID: 113814736 Músculo	Alinea parcialmente

Cuadro 3. Oligonucleótidos para amplificar las secuencias de las isoformas de la HK de *L. vannamei* y evaluar su expresión por qPCR.

Oligonucleótido	Secuencia (5'—3')	GC %	Tm (°C) *	Referencia
HK2Fw1	ATGATGGAGATAGTCGCTGCGG	55	64.2	Este estudio
HK2Fw2	ATGAAGACTCTCTGTAATAACAAGG	56	60.9	Este estudio
HK2Fw3	ATGGCCAGTCAGAAGGTAAAG	50	62.1	Este estudio
HK2Rv1	CTATCTCATGGCTGAGGTCCTG	55	64.2	Este estudio
HK2Fw4	TGTTGCTGTGGATGGATCTGT	50	62.1	Este estudio
HK2Rv1	CTATCTCATGGCTGAGGTCCT	55	64.2	Este estudio
HK1Fw1	ATGTCATCTATGACTGAGTTCCC	43	60.9	Este estudio
HKgenR	CTAGATTTGGGGAGATGGATG	48	59.5	Soñanez-Organis <i>et al.</i> , 2011
HK1F3	TCCAGTCCTGAGAGGAAAT	47	58.7	Soñanez-Organis <i>et al.</i> , 2011
HKLvanR	GAAACCGAGCTGTAAGTTTC	45	57.9	Soñanez-Organis <i>et al.</i> , 2011
PCF5	AGTCTGTGATAGAGTTCTTCC	43	57.5	Granillo-Luna <i>et al.</i> , 2022
PCR5	ATTCATCGGTGCCATTGACTC	48	59.5	Granillo-Luna <i>et al.</i> , 2022
L8F2	TAGGCAATGTCATCCCCATT	45	56.4	Trasviña-Arenas <i>et al.</i> , 2013
L8R2	TCCTGAAGGGAGCTTTACACG	52	61.2	Trasviña-Arenas <i>et al.</i> , 2013

Las propiedades de los oligonucleótidos se evaluaron en <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>.

*Tm ajustada a sales.

6.2. Secuencias Codificantes de las Isoformas de la HK de *L. vannamei*

Los productos obtenidos mediante PCR convencional se analizaron en electroforesis en gel de agarosa (Fig. 5). Como templado se utilizó cDNA de branquias, hepatopáncreas y músculo de camarones en condiciones de normoxia. La amplificación de la secuencia de la HK-1 se realizó con los oligonucleótidos HK1Fw1/HKgen, las bandas obtenidas coinciden con el tamaño esperado de 1,455 pb, sin embargo, sólo se obtuvieron amplicones de cDNA de tejido de branquias y hepatopáncreas (Fig. 5A). Para la HK-2 se usaron los oligonucleótidos HK2Fw3/HK2Rv1 y el tamaño de las bandas del gen coincide al producto esperado de 1,344 pb (Fig. 5B).

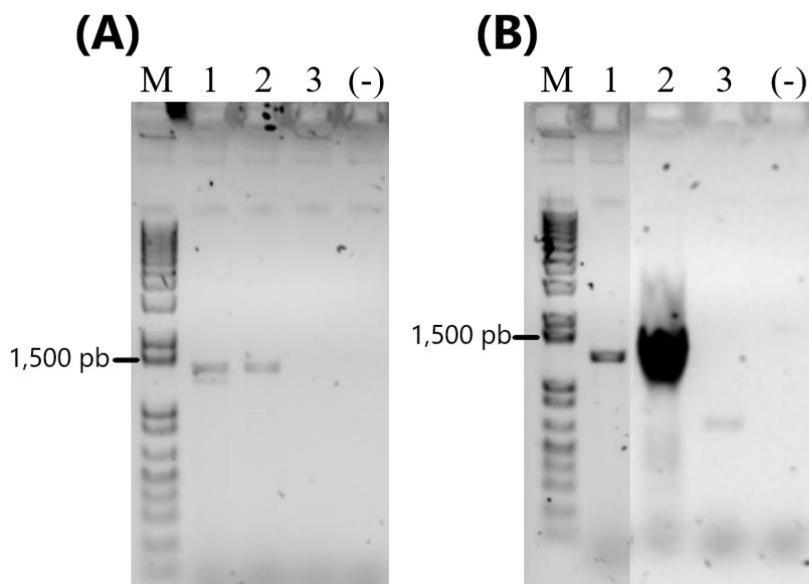


Figura 5. Electroforesis de los productos de PCR de las secuencias de las isoformas de la HK. (A) Gel de los productos de PCR de la secuencia codificante de la HK-1. (B) Gel de los productos de PCR de la secuencia codificante de la HK-2. En ambas, los carriles corresponden a: M) Marcador de tamaño molecular GeneRuler 1 Kb Plus (Thermo Fisher Scientific), 1) cDNA de branquias, 2) cDNA de hepatopáncreas, 3) cDNA de músculo, (-) Control negativo sin cDNA.

Los productos de PCR amplificados se ligaron al vector pGEM-T Easy y se clonaron en *E. coli* TOP10. Se seleccionaron las colonias utilizando el sistema de Blue/White *screening* del mismo vector y mediante PCR de colonias, donde en todas las clonas positivas se obtuvieron bandas del

tamaño esperado en cada caso (1,455 pb para HK-1 y 1,344 pb para HK-2) (Fig. 6). En el análisis de las clonas recombinantes correspondientes al producto de PCR de HK-1 de branquias se detectó una diferencia de tamaño de las bandas, por lo que se seleccionaron las colonias 5 y 6 para la extracción del DNAp (Fig. 6A). Asimismo, de las colonias correspondientes al amplicón de HK-1 de hepatopáncreas, se seleccionaron las colonias 2 y 6 debido a que también presentaron bandas de tamaño diferente (Fig. 6B). Las colonias seleccionadas conteniendo el amplicón de HK-2 de branquias fueron las clonas 1 y 3 (Fig. 6C), mientras las correspondientes al amplicón HK-2 de hepatopáncreas se seleccionaron las colonias 1 y 4 (Fig. 6D). Después de la confirmación por digestión con enzimas de restricción del tamaño del inserto en cada caso, se purificó el DNAp de todas las colonias seleccionadas para su secuenciación.

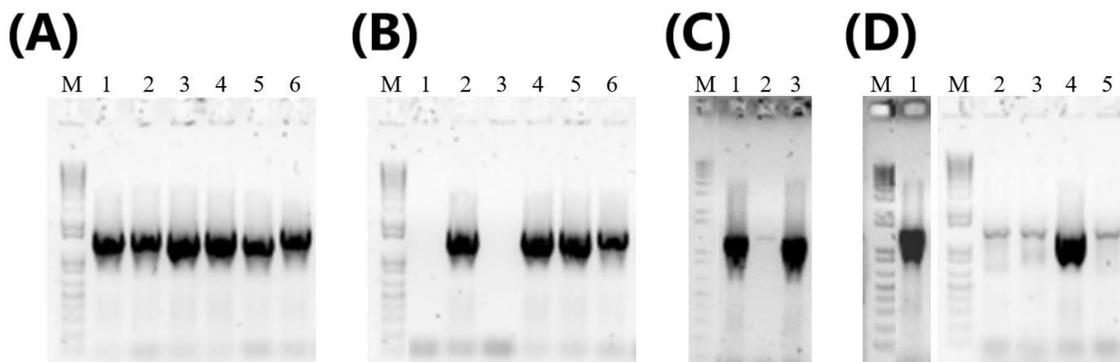


Figura 6. Análisis de clones recombinantes mediante PCR de colonia. (A) Clones recombinantes con la ligación correspondiente al producto de PCR de HK-1 de cDNA de branquias. (B) Clones recombinantes con la ligación correspondiente al producto de PCR de HK-1 de cDNA de hepatopáncreas. (C) Clones recombinantes con la ligación correspondiente al producto de PCR de HK-2 de cDNA de branquias. (D) Clones recombinantes con la ligación correspondiente al producto de PCR de HK-1 de cDNA de hepatopáncreas.

La secuencia obtenida de mayor tamaño fue denominada como HK-1 larga, y corresponde a la reportada anteriormente por Soñanez-Organis *et al.*, (2011) amplificada a partir de cDNA de branquias y hepatopáncreas. La isoforma HK-1 larga está compuesta por 1,452 nucleótidos que codifican a 484 aminoácidos con un peso molecular estimado de 53.3 kDa y un punto isoelectrónico teórico (pI) de 5.54 (Figura 7). La segunda secuencia obtenida de branquias y hepatopáncreas fue nombrada como HK-1 corta, ya que contiene 1,302 nucleótidos que codifican para 433

aminoácidos, con un peso molecular estimado de 47.7 kDa y un pI teórico de 5.6 (Figura 8). Esta isoforma presenta una delección de 153 nucleótidos, correspondientes a 51 aminoácidos, ubicada hacia el extremo C-terminal de la secuencia, con respecto a la secuencia de la isoforma HK-1 larga. La HK reportada por Soñanez *et al.*, (2011) y las isoformas HK-1 larga y HK-1 corta presentan un 99.73 y 99.38% de identidad a nivel de nucleótidos y un 99.66 y 89.05% a nivel de aminoácidos, respectivamente. Las diferencias en la longitud de las isoformas HK-1 larga y HK-1 corta corresponden a los amplicones obtenidos mediante PCR de colonias en el análisis de clonas recombinantes (Fig. 6A y 6B).

En la Figura 7 se señalan en un cuadro rojo los nucleótidos que están presentes en la isoforma HK-1 larga, pero que no se encuentran en la HK-1 corta (Figura 8). La isoforma HK-1 corta obtenida en este estudio no está reportada en el genoma del camarón (Zhang *et al.*, 2019) ni en las secuencias del transcriptoma del camarón publicado por Ghaffari *et al.*, (2014). Sin embargo, en este trabajo esta secuencia fue amplificada y secuenciada de los tejidos de branquias y hepatopáncreas del camarón. Es posible que la HK-1 corta sea generada a partir del corte y empalme de exones e intrones en el proceso de maduración de transcritos durante la transcripción o que los individuos estudiados para obtener la información del genoma y transcriptoma de esta especie presenten diferencias a nivel genómico o transcriptómico.

Asimismo, se obtuvo sólo una secuencia codificante completa de la isoforma denominada como HK-2 de *L. vannamei*, obtenida a partir de tejido de branquias y hepatopáncreas (Fig. 6C y 6D). La secuencia de la isoforma HK-2 se compone de 1,344 nucleótidos que codifican para una proteína de 447 aminoácidos con un peso molecular estimado de 49.48 kDa y un pI teórico de 5.26 (Figura 9). La secuencia nucleotídica de la isoforma HK-2 comparte un 99.85% de identidad con la secuencia anotada en el genoma del camarón como HK-2 variante de transcrito X3 (No. GenBank: XP_027211889.1) (Cuadro 2) y a nivel de aminoácidos las secuencias deducidas presentan un 100% de identidad.

La secuencia de la HK-2 del camarón obtenida experimentalmente en el presente trabajo corresponde a la variante de transcrito X3. A pesar de que se intentaron amplificar y secuenciar las variantes de transcrito X1 y X2 de la HK-2 de tejido de branquias, hepatopáncreas o músculo de camarones en distintas condiciones de oxigenación (normoxia o hipoxia), no fue posible obtener amplicones de estas variantes de transcrito en las condiciones utilizadas. Esto podría deberse a que estas variantes de transcrito se encuentran en muy baja concentración o que se expresan en condiciones o tejidos distintos a los evaluados.

```

>>>HK1Fw1>>> 1 to 23
1 M S S M T E F P V L C I G D E H K K E K V K Q I L
1 ATGTCATCTATGACTGAGTTCCTGTGCTCTGTATTGGAGATGAACATAAAAAAGAAAAGGTAAAGCAGATATTA

26 S P L V L T K S Q Q Q E V S S V F L D E M R L G L
76 TCTCCTCTCGTGTAAACAAAGTCGCAGCAACAGGAAGTTAGTAGTCTTCCTCGATGAAATGCGTTTGGGCCTT
>>>HK1F3>>> 154 to 174
51 A S S P E R K S L L M E N T F I P E L P D G T E
151 GCTTCCAGTCTGAGAGGAAATCTTCCCTTTTGATGGAGAATACTTTTATCCCTGAACTTCTGATGGTACAGAA

76 N G E Y L A L D L G G T N F R V M Y V K M K D G S
226 AATGGTGAATATTTGGCTCTAGACCTTGGAGGAACCAATTTTCGAGTCATGTATGTCAAGATGAAGGATGGAAGT

101 I T E E I V D Y Y H V P E E R R L G P G A E L F D
301 ATTACGGAGGAGATTGTGGACTACTATCATGTGCCAGAAGAGCGACACTTGGACCTGGAGCAGAACTCTTTGAT
>>>HKLvanR>>> 428 to 447
126 Y L A E C L G N F I K K R K L G G R N L Q L G F T
376 TATCTTGCTGAATGTCTTGAACTTTATAAAGAAAAGAAAATTAGGAGGGCGAAACTTACAGCTTGGTTTCACT

151 F S F P M T Q K S L D V G I L L W T K S F N C P
451 TTCTCATTCCCAATGACTCAGAAGAGTCTTGATGTGGAATATTGTTATCTTGGACAAAATCTTTCAACTGCCTT

176 G V V G E D A V K M L N D A I Q K H G G L D I T V
526 GGTGTGTGGTGGAGGATGCTGTAAAGATGCTTAATGATGCTATTCAGAAGCATGGTGGATTAGATATTACAGTC

201 T A V L N D T T G T L V Q G A Y M D K R C A L G M
601 ACAGCAGTTCTAATGACACTACAGGCACACTCGTACAAGGTGCTTATATGGACAAGCGATGTGCTCTGGGCATG

226 I L G T G S N G C Y I E K V E N I E K W H G K H Q
676 ATTCTTGGCACTGGCTCTAATGGCTGCTACATAGAAAAGTTGAGAATATAGAGAAGTGGCATGGAAGCACCAG

251 E A E M I V D I E W G A F G D N G V L D F I K T S
751 GAAGCCGAGATGATTGTGGACATAGAATGGGGTGCCTTTGGGGATAATGGTGTACTAGATTTTCATCAAGACAAGC

276 W D R A V D S K S L L V K S F T F E K Y F A G K Y
826 TGGGACAGAGCTGTAGACAGCAAATCACTGCTTGTAAATCATTACCTTTGAAAAGTACTTTGCTGGAAAATAC

301 L G D L Y R E I L L L S K E G L F C S G N I G K
901 TTAGGAGACTTATATCGTGAGATTTTACTCACTCTGTCCAAGAAGGACTCTTCTGTTCTGGTAACATCGGCAAG

326 L D T Q G A I T T T D V S N I E R D N M Q G D S E
976 TTAGATACGCAGGGTGAATTACTACCCTGATGTTTCTAACATTGAGAGGATAAATATGCAGGGCGACTCAGAG

351 T T R K V I E G V G L T C D E E D L Y I A Q Y V A
1051 ACTACTAGAAAAGTTCATCGAGGGCGTCGGGCTTACGTGTGATGAGGAGGATTTGTACATTGCACAATATGTTGCT

376 G L I S Y R G V L L V S L L T S I L L V R M E R P
1126 GGTCTCATTTCTACCGTGGTGTCTTCTGTTTCTTATTGACAAGCATCCTGCTGGTGCATGGAGAGGCCA

401 H C T V A I D G S L F Q Y H P R F R P L M E R L I
1201 CACTGCACAGTTGCTATTGACGGATCCCTCTTCCAGTATCACCCGAGATTTAGACCGCTCATGAAAGGCTCATT

426 A E F A P G R P F N L L L V H D G S G K G S A L A
1276 GCAGAGTTTGTCCCGGCGAGACCATTTAACCTGCTGCTGGTTCACGATGGCTCGGGGAAAGGATCAGCTTTAGCA

451 A S I A E R L Q K R L G K G K A N P L G G G S S Q
1351 GCTTCCATTGCTGAGAGACTGCAGAAAAGGCTGGGAAAAGGAAAGGCGAATCCACTTGGAGGAGGCAGCAGCCAA
>>>HKgenR>>> 1435 to 1455
476 G V P H P S P Q I *
1426 GGAGTCCCTCATCCATCTCCCAATCTAG

```

Figura 7. Secuencia de nucleótidos y deducida de aminoácidos de la isoforma HK-1 larga de *L. vannamei*. Dentro del recuadro rojo se señalan los nucleótidos/aminoácidos que no están presentes en la isoforma HK-1 corta. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación y evaluación de la expresión génica se muestran sobre las secuencias. Las flechas (↓) indican los posibles sitios de fosforilación.

```

>>>HK1Fw1>>> 1 to 23
1 M S S M T E F P V L C I G D E H K K E K V K Q I L
1 ATGTCATCTATGACTGAGTTCCTGTGCTCTGTATTGGAGATGAACATAAAAAAGAAAAGGTAAAGCAGATATTA

26 S P L V L T K S Q Q Q E V S S V F L D E M R L G L
76 TCTCCTCTCGTGTAAACAAAGTCGCAGCAACAGGAAGTTAGTAGTGTCTTCCCTCGATGAAATGCGTTTGGGCCTT
>>>HK1F3>>> 154 to 172
51 A S S P E R K S ↓ L L M E N T F I P E L P D G T E
151 GCTCCAGTCCCTGAGAGAAATCTTCCCTTTTGATGGAGAATACTTTTATCCCTGAACTTCTGATGGTACAGAA

76 N G E Y L A L D L G G T N F R V M Y V K M K D G S
226 AATGGTGAATATTTGGCTCTAGACCTTGGAGGAACCAATTTTCGAGTCATGTATGTCAAGATGAAGGATGGAAGT

101 I T E E I V D Y Y H V P E E R R L G P G A E L F D
301 ATTACGAGGAGATTGTGGACTACTATCATGTGCCAGAAGAGCGACGACTTGGACCTGGAGCAGAACTCTTTGAT
>>>HKLvanR>>> 428 to 44
126 Y L A E C L G N F I K K R K L G G R N L Q L G F T
376 TATCTTGCTGAATGTCTTGAACTTTATAAAGAAAAGAAAATTAGGAGGGCGAACTTACAGCTTGGTTTCACT

151 F S F P M T Q K S L D V G I L L ↓ W T K S F N C P
451 TTCTCATTCCTCAATGACTCAGAAGAGTCTTGATGTTGGAATATTGTTATCTTGGACAAAATCTTTCAACTGCCCT

176 G V V G E D A V K M L N D A I Q K H G G L D I T V
526 GGTGTGTTGGTGAGGATGCTGTTAAGATGCTTAATGATGCTATTCCAGAAGCATGGTGGATTAGATATTACAGTC

201 T A V L N D T T G T L V Q G A Y M D K R C A L G M
601 ACAGCAGTTCTTAATGACACTACAGGCACACTCGTACAAGGTGCTTATATGGACAAGCGATGTGCTCTGGGCATG

226 I L G T G S N G C Y I E K V E N I E K W H G K H Q
676 ATTCTTGGCACTGGCTCTAATGGCTGCTACATAGAAAAAGTTGAGAATATAGAGAAGTGGCATGGAAAGCACACAG

251 E A E M I V D I E W G A F G D N G V L D F I K T S
751 GAAGCCGAGATGATTGTGGACATAGAATGGGGTGCCTTTGGGGATAATGGTGTACTAGATTTTCATCAAGACAAGC

276 W D R A V D S K S L L V K S F T D N M Q G D S E T
826 TGGGACAGAGCTGTAGACAGCAAATCACTGCTTGTAAATCATTACCGGATAATATGCAGGGCGACTCAGAGACT

301 T R K V I E G V G L T C D E E D L Y I A Q Y V A G
901 ACTAGAAAAGGTCATCGAGGGCGTCGGGCTTACGTGTGATGAGGAGGATTTGTACATTGCACAATATGTTGCTGGT

326 L I S Y R G V L L V S L L T S I L L V R M E R P H
976 CTCATTTCCCTACCGTGGTGTCTTCTCGTTTCCCTTATTGACAAGCATCCTGCTGGTGCATGGAGAGGCCACAC

351 C T V A I D G S L F Q Y H P R F R P L M E R L I A
1051 TGCACAGTTGCTATTGACGGATCCCTCTTCCAGTATCACCCGAGATTTAGACCGCTCATGAAAAGGCTCATTGCA

376 E F A P G R P F N L L L V H D G S G K G S A L A A
1126 GAGTTTGCTCCCGGAGACCATTTAACCTGCTGCTGGTTCACGATGGCTCGGGGAAAGGATCAGCTTTAGCAGCT

401 S I A E R L Q K R L G K G K A N P L G G G S S Q G
1201 TCCATTGCTGAGAGACTGCAGAAAAGGCTGGGAAAAGGAAAGGCGAATCCACTTGGAGGAGGCAGCAGCCAAGGA
>>>HKgenR>>> 1282 to 1302
426 V P H P S P Q I *
1276 GTCCTCATCCATCTCCCCAAATCTAG

```

Figura 8. Secuencia de nucleótidos y deducida de aminoácidos de la isoforma HK-1 corta de *L. vannamei*. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación y evaluación de la expresión génica se muestran sobre las secuencias. Las flechas (↓) indican los posibles sitios de fosforilación.

6.3. Análisis Bioinformático de las Isoformas HK-1 y HK-2 de *L. vannamei*

6.3.1. Comparación de las Secuencias Aminoacídicas de las Isoformas de la HK por Alineamientos Múltiples

Las secuencias aminoacídicas de las isoformas de la HK de *L. vannamei* fueron alineadas junto con secuencias homólogas de diversas especies identificadas mediante la búsqueda en BLAST (Cuadro 1). En la figura 10 se muestra el alineamiento múltiple de las HK tipo 1, donde se observa una alta identidad entre las secuencias alineadas, ya que el porcentaje de identidad de la isoforma HK-1 larga de *L. vannamei* con las secuencias de otros organismos resultó entre el 93.06%, con el camarón *P. monodon*, y el 50.11% con el avispon asiático *Vespa mandarinia*. Como era de esperarse, las isoformas de la HK-1 del camarón comparten un alto porcentaje de identidad con las secuencias de otros peneidos. La isoforma HK-2 del camarón se alineó con HKs tipo 2 de otras especies (Cuadro 1), de manera separada de las HKs tipo 1, ya que pertenecen a la subfamilia de hexocinasas 2 (Profiles: PS51748). En este caso, el alineamiento múltiple también mostró un alto porcentaje de identidad entre la isoforma HK-2 del camarón blanco con las secuencias alineadas, se presentó entre el 99.11%, con el camarón *P. monodon*, hasta el 50.22% con el pez *Maylandia zebra* (Fig. 11). Dos o más secuencias aminoacídicas son consideradas homólogas si comparten al menos el 30% de identidad (Pearson, 2013). Por lo que, las secuencias de las isoformas de la HK alineadas de las diferentes especies son homólogas y los altos intervalos de identidad mencionados indican la conservación evolutiva de esta enzima.

Las isoformas de la HK (HK-1 larga, HK-1 corta y HK2) identificadas en *L. vannamei* forman parte de la superfamilia de hexocinasas (Pfam: IPR001312) así como el resto de las secuencias de la HK de otras especies. Se identificaron también los dominios N-terminal y C-terminal señalados en ambos alineamientos de las HKs resaltados en color azul y verde, respectivamente (Figuras 10 y 11). En otros organismos se ha identificado el sitio catalítico donde se unen los sustratos entre estos dos dominios (Kuser *et al.*, 2000). El dominio N-terminal es la región reguladora, aunque en ambos dominios hay sitios de unión de sustratos (Tsai & Wilson, 1997). Además, todas las secuencias de las isoformas de la HK alineadas (Figuras 10 y 11) pertenecen a la misma

superfamilia de ATPasas (InterPro: IPR043129) que incluye diversas cinasas, proteínas de choque térmico, entre otras (Wilson & Shwab, 1996).

Los aminoácidos involucrados en los sitios de unión a glucosa, G-6-P, ATP y Mg^{2+} identificados en las HKs de mamíferos (Mulichak *et al.*, 1998; Wilson & Shwab, 1996) también están presentes en las isoformas de la HK de *L. vannamei* y en el resto de las secuencias alineadas de HKs de otras especies (Figuras 10 y 11). Los residuos implicados en la catálisis se encuentran en regiones altamente conservadas en todas las secuencias alineadas de ambas isoformas de la HK. Estos residuos también están presentes en las enzimas de otros invertebrados como en las isoformas de la HK (DM1 y DM2) de *D. melanogaster* (Jayakumar *et al.*, 2001).

En el caso de la isoforma HK-1 corta identificada en *L. vannamei*, es posible observar en el alineamiento (Fig. 10) que la delección de los 51 aminoácidos presentes en la isoforma HK-1 larga del camarón es específica para esta secuencia ya que estos residuos se encuentran presentes en el resto de las secuencias de la HK alineadas con una alta conservación. Sin embargo, cabe destacar que, en esta delección, que inicia en el residuo 288 con respecto a la escala del alineamiento, no cae en dominios de unión a sustrato, por lo que probablemente en caso de que la HK-1 corta sea traducida en las células se mantenga su actividad enzimática.

La vía glucolítica se considera una ruta metabólica altamente conservada entre los diferentes taxa en términos de identidad de secuencias aminoacídicas, estructura tridimensional y por ende conservación de genes (Fothergill-Gilmore & Michels, 1993). Debido a lo anterior, es de esperar que los residuos necesarios para llevar la catálisis de las enzimas glucolíticas, en especial de las enzimas reguladoras de esta vía, se encuentren conservados entre especies.

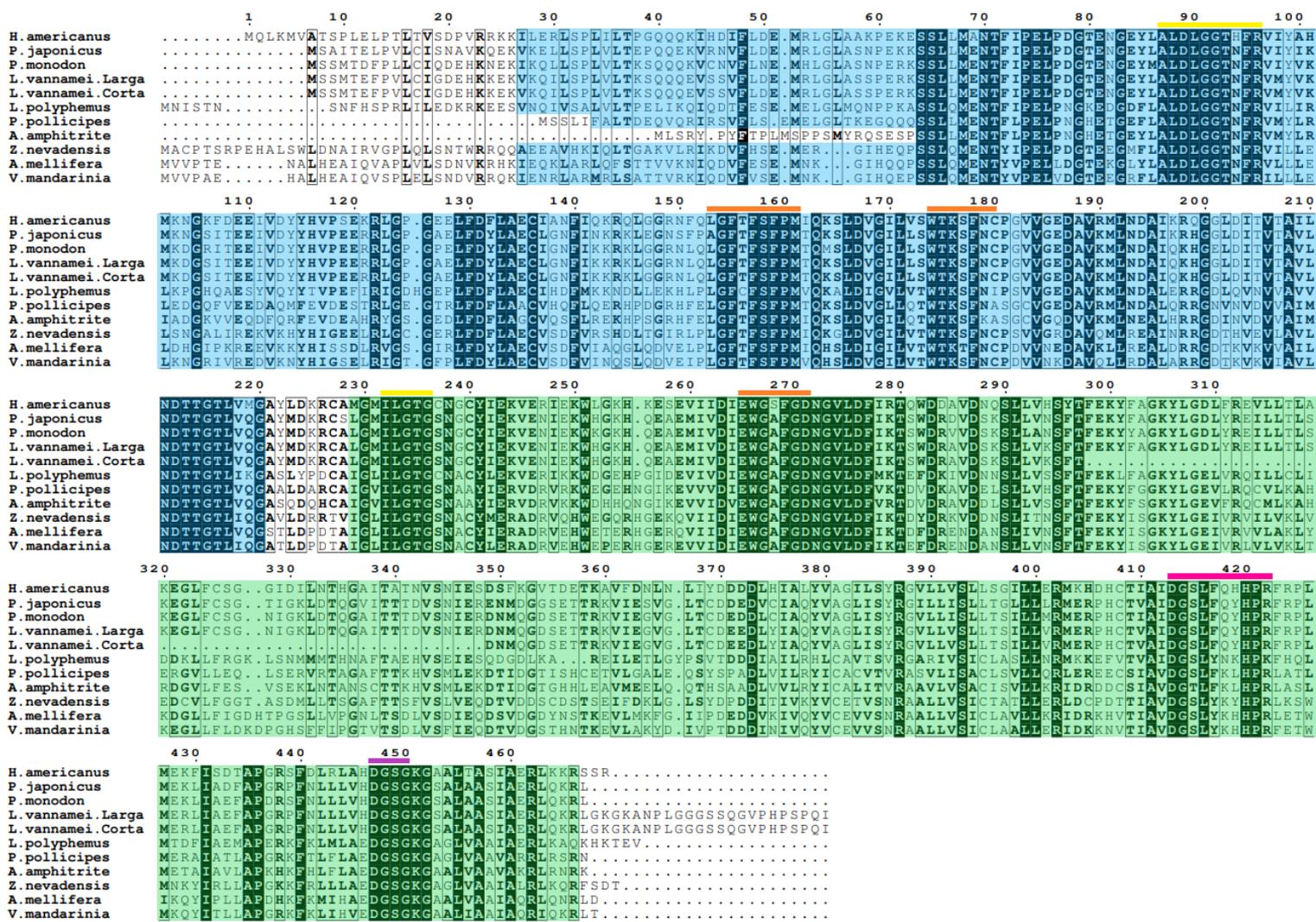


Figura 10. Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de HK-1 de *L. vannamei* y otras especies. Se señalan con letras blancas resaltadas en negro; los aminoácidos con 70% de identidad se señalan con letras en negritas. Las regiones con alta identidad de secuencia se indican en recuadros negros. Los dominios N-terminal y C-terminal se indican con azul y verde, respectivamente. Los residuos implicados en la unión con G-6-P, glucosa, ATP y Mg²⁺ se indican con líneas de color amarillo, naranja, rosa y violeta, respectivamente.

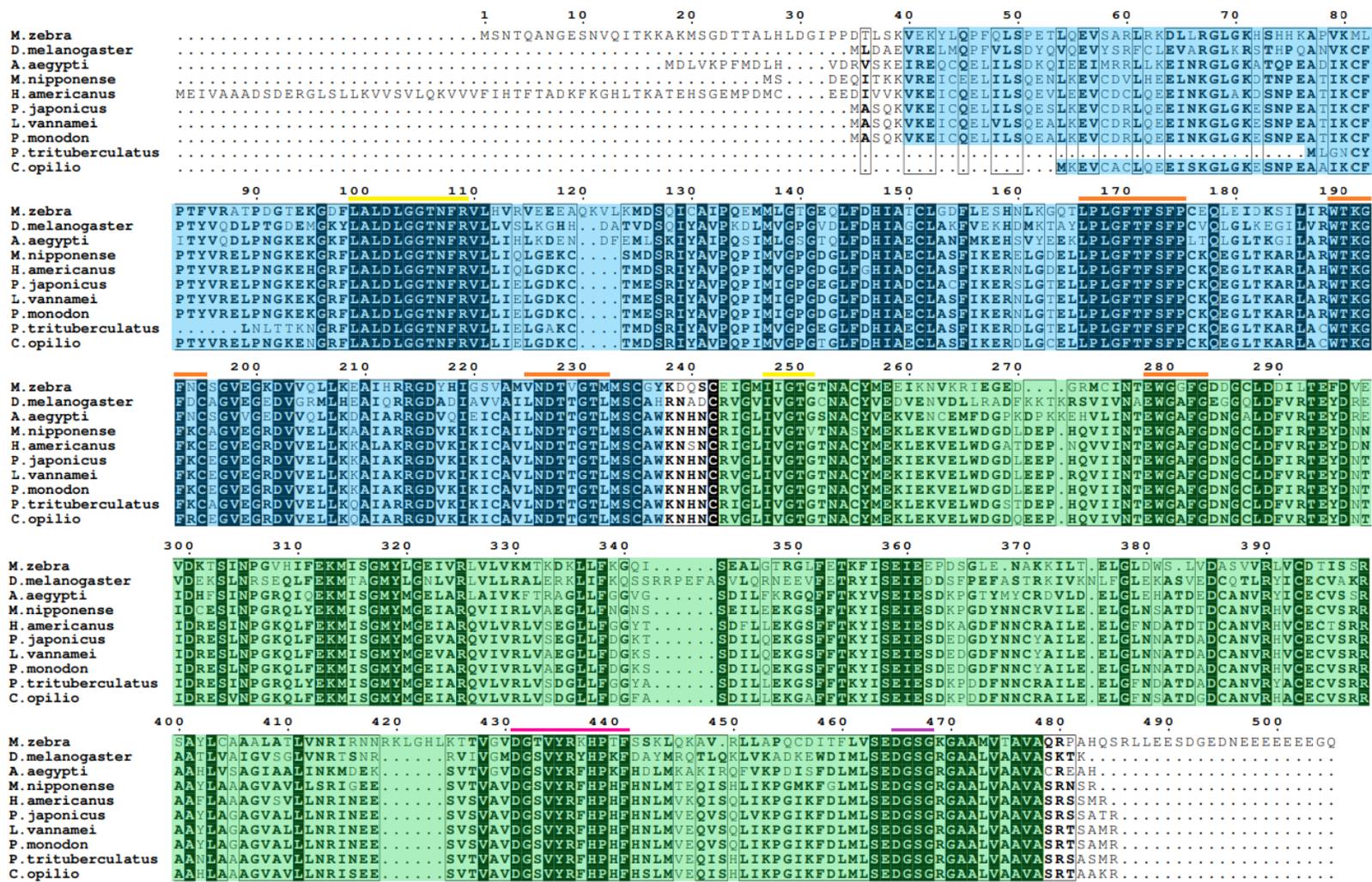


Figura 11. Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de HK-2 de *L. vannamei* y otras especies. Se señalan los aminoácidos con 100% de identidad en letras blancas resaltadas en negro; los aminoácidos con 70% de identidad se señalan con letras en negritas. Las regiones con alta identidad de secuencia se indican en recuadros negros. Los dominios N-terminal y C-terminal se indican con azul y verde, respectivamente. Los residuos implicados en la unión con G-6-P, glucosa, ATP y Mg²⁺ se indican con líneas de color amarillo, naranja, rosa y violeta, respectivamente.

6.3.2. Modificaciones Postraduccionales de las HKs de *L. vannamei*

Por otro lado, en la búsqueda de sitios putativos de fosforilación mediante análisis bioinformáticos, se identificaron varios aminoácidos en las secuencias de las isoformas de la HK del camarón. En la isoforma HK-1 larga se identificaron a los residuos S⁵⁹, S¹⁶⁷ y T³¹¹ como posibles sitios de fosforilación (Fig. 7). La isoforma HK-1 corta sólo presentó los residuos S⁵⁹ y S¹⁶⁷ como sitios de fosforilación teóricos (Fig. 8), la T³¹¹ identificada para la HK-1 larga se encuentra dentro de la deleción de los 51 residuos que no están presentes en la HK-1 corta. Además, los posibles sitios de fosforilación identificados en la isoforma HK-2 fueron en los aminoácidos S³ y S¹³⁵ (Fig. 9).

En otros organismos se ha estudiado la regulación por fosforilación de la HK. Por ejemplo, en las ranas *Xenopus laevis* y *Rana sylvatica*, donde se identificó mediante análisis bioinformáticos que estas y otras cinasas regulan la actividad de la HK de manera postraducciona en respuesta al estrés por deshidratación y anoxia (Childers & Storey, 2016; Dieni & Storey, 2011; Holden & Storey, 1997). También, en la ardilla *Spermophilus richardsonii* se evaluó la regulación de HK en estado de hibernación. Los resultados demostraron que la fosforilación por PKA aumentó significativamente la actividad de la HK muscular de ardillas en hibernación y que la acción de proteínas fosfatasa (responsables de la desfosforilación de HK) redujo la actividad. Estos cambios en el estado de fosforilación de la enzima permiten regular su actividad en condiciones de supresión metabólica (Abnous & Storey, 2008). También, en la rana *R. sylvatica* se estudió la regulación de la HK mediante fosforilación reversible en condiciones de congelación y se demostró que la HK del músculo de ranas congeladas tiene menor actividad y afinidad por sus sustratos y está presente en un estado de fosforilación más bajo, en comparación con la de ranas control, donde la HK se encuentra en un estado de fosforilación más alto, mayor actividad y mayor afinidad a glucosa y ATP (Dieni & Storey, 2011).

Por otra parte, en el molusco marino *Littorina littorea* se evaluó el efecto de la anoxia en el estado de fosforilación de las isoformas de la HK, la HK hepática y HK muscular. En el estudio se demostró que la desfosforilación de la HK hepática en respuesta a la anoxia aumenta la afinidad de la HK por glucosa, alternativamente, para la HK muscular la transición al estado anóxico conduce a la fosforilación de la enzima y a una disminución en la afinidad por ATP. Esta diferencias en el estado de fosforilación tejido-específico de las isoformas de la HK indican que durante la anoxia

los órganos del molusco presentan diferentes funciones y necesidades y por ende se deben ajustar las propiedades cinéticas de la enzima (Lama *et al.*, 2013). En crustáceos también ha sido estudiado el estado de fosforilación de la HK en respuesta a estresores, como el caso del cangrejo *Orconectes virilis* donde se evaluaron las propiedades cinéticas y niveles de fosforilación de la HK muscular en condiciones de anoxia y se encontró que la actividad de la HK aumenta pero disminuye el nivel de fosforilación (Dawson & Storey, 2012).

En estos estudios se demuestra que en condiciones de estrés donde los organismos se ven obligados a reducir su tasa metabólica, la fosforilación reversible de la HK es un mecanismo crucial para regular el metabolismo. En la HK-1 larga de *L. vannamei* se mostró a la T³¹¹ como posible sitio de fosforilación, sin embargo, este residuo está dentro de la delección que presenta la isoforma HK-1 corta (Figuras 7 y 8), lo que podría tener implicaciones en cuanto a la regulación de la actividad enzimática de estas isoformas, ya que como se ha mencionado, la fosforilación reversible de la HK es una forma de regulación de su actividad en los organismos. Los posibles sitios de fosforilación identificados en las secuencias de las isoformas de la HK del camarón dan indicios sobre la regulación a nivel postraducciona de estas isoformas. Sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales que ayuden a dilucidar el mecanismo de regulación de las isoformas de la HK del camarón en distintos niveles moleculares.

La HK es considerada una enzima clave en el metabolismo de carbohidratos de la mayoría de los organismos, donde se encuentra presente como una mezcla de isoformas con una distribución tisular específica (Cárdenas *et al.*, 1998). Las isoformas HK-1 y HK-2 del camarón blanco tienen un peso molecular estimado similar a las enzimas de otros invertebrados de aproximadamente 50 kDa y presentan posibles sitios de fosforilación por actividad de proteínas cinasas que se ha reportado como un mecanismo de regulación postraducciona de esta enzima para otros organismos (Ureta *et al.*, 1987).

6.3.3. Análisis Filogenético

Para el análisis filogenético se construyeron dos árboles para las isoformas de la HK-1 y HK-2 (Fig. 12) a partir de 32 y 24 secuencias de aminoácidos de diversas especies, respectivamente

(Cuadro 1). Las isoformas HK-1 larga y HK-1 corta del camarón se ubicaron junto con las HKs de crustáceos, separadas del resto de las secuencias de otras especies (valor de bootstrap de 100%) (Fig. 12A). Además, las isoformas de la HK-1 de vertebrados están agrupadas en el mismo clado separadas de las enzimas de invertebrados. Por otro lado, el árbol filogenético de las secuencias de las HKs tipo 2 muestra que la isoforma HK-2 del camarón está agrupada en el mismo clado que las secuencias de los peneidos *P. japonicus* y *P. monodon*, confirmado por un valor de bootstrap de 93% (Fig. 12B). Sin embargo, la HK del camarón *M. nipponense* fue ubicada en un clado contiguo de crustáceos separada de los camarones peneidos mencionados (bootstrap de 78%). Asimismo, la HK-2 del camarón se ubicó en un clado específico para crustáceos, separada de las HKs de otros invertebrados (bootstrap de 65%). Además, las HKs de vertebrados se agruparon en una rama aparte de las secuencias de la HK de invertebrados.

En ambos casos, los árboles filogenéticos ubican a las isoformas de la HK del camarón blanco más cercanas a las enzimas de otros camarones peneidos, aunque pertenecientes al mismo grupo de crustáceos decápodos. Esto era de esperarse, ya que entre más cercanas sean las especies filogenéticamente, sus proteínas homólogas se mantienen agrupadas dentro de un mismo clado.

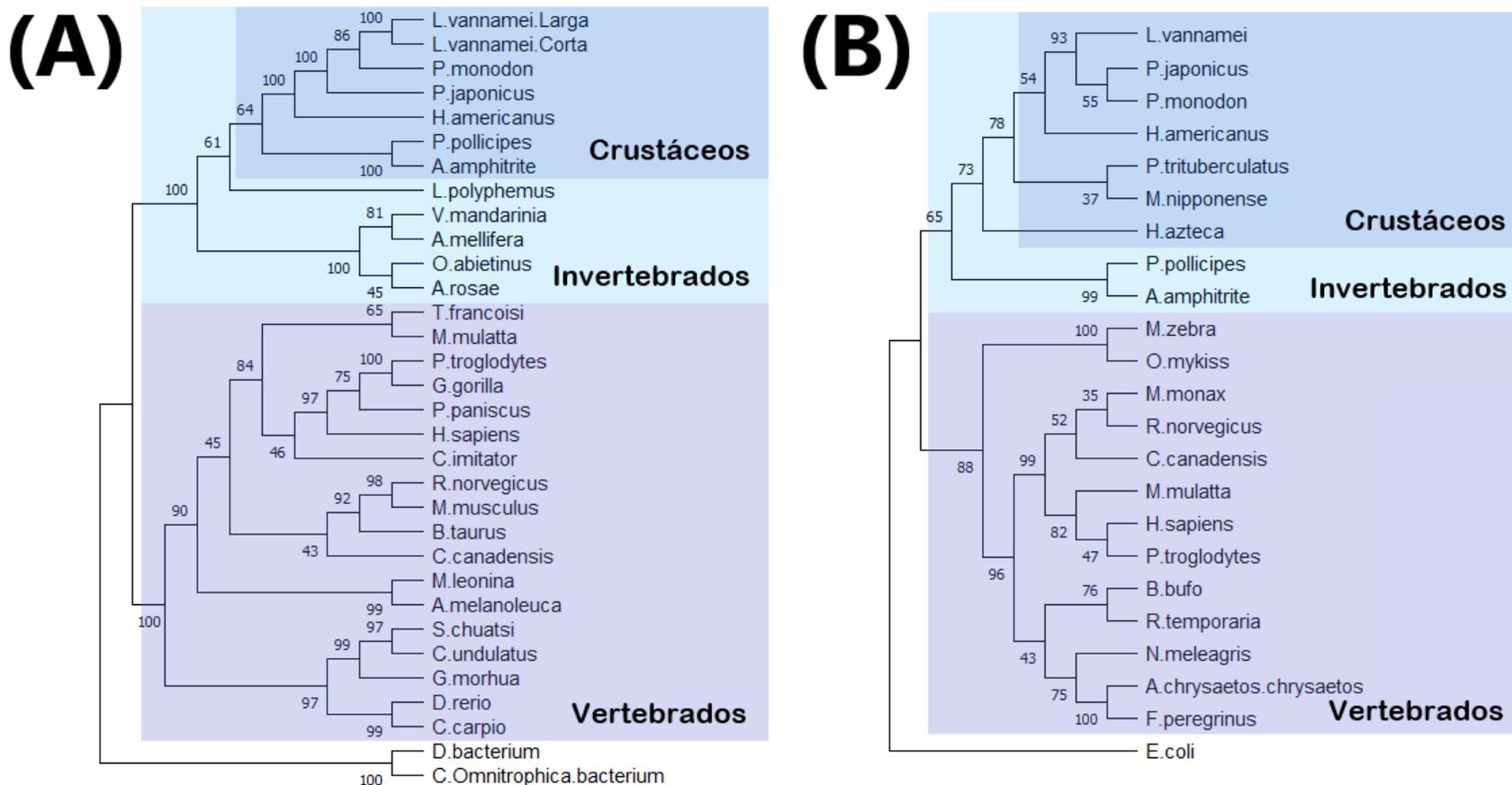


Figura 12. Análisis filogenético de las secuencias de la HK de diversas especies. (A) Secuencias de isoformas de la HK-1. (B) Secuencias de isoformas de la HK-2. Los árboles fueron construidos utilizando el método de máxima verosimilitud. Cada rama fue determinada a partir 1,000 réplicas de bootstrap. Se seleccionaron las secuencias de HK-1 de *Deltaproteobacteria bacterium* y *Candidatus Omnitrophica bacterium*, y de la secuencia de la HK-2 de *Escherichia coli*, respectivamente para enraizar cada árbol.

6.3.4. Estructura Tridimensional de las Isoformas de la HK de *L. vannamei*

Las estructuras tridimensionales de las isoformas de HK del camarón fueron obtenidas mediante modelación por homología utilizando como templado una estructura cristalográfica de otra especie con el mayor porcentaje de identidad en cada caso. Para las isoformas HK-1 larga y HK-1 corta de *L. vannamei* se utilizó como templado la HK-1 humana (PDB ID: 1CZA) (Aleshin *et al.*, 2000) que presentó un 36.89% y 38.19% de identidad con las secuencias del camarón, respectivamente (Fig. 13A, 13B). La isoforma HK-2 del camarón blanco fue modelada con base en la estructura cristalográfica resuelta de la HK-2 humana (PDB ID: 2NZT) (Nawaz *et al.*, 2018) con un porcentaje de identidad del 53.33% (Fig. 13C). De acuerdo con lo mencionado anteriormente, cuando existe un porcentaje de identidad igual o mayor al 30% entre dos secuencias, estas se pueden considerar homólogas (Pearson, 2013), por lo que los porcentaje compartidos entre las isoformas de la HK del camarón y del humano se consideran aceptables.

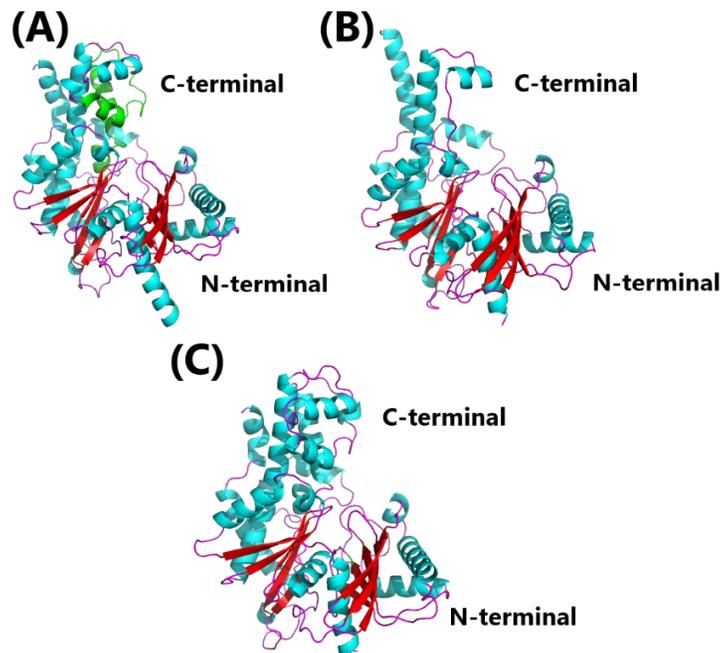


Figura 13. Modelado por homología de la estructura tridimensional de las isoformas de HK de *L. vannamei*. (A) Isoforma HK-1 larga. Los residuos que no están presentes en la isoforma HK-1 corta se muestran en verde. (B) Isoforma HK-1 corta. (C) Isoforma HK-2. Se señalan los dominios N-terminal y C-terminal, las hélices α se muestran de color azul; las hojas β en color rojo; los lazos en color magenta.

Las tres estructuras modeladas de HKs de *L. vannamei* corresponden a un monómero con dos dominios de distinto tamaño, denominados dominio grande y dominio chico. Estos monómeros presentan un plegado similar a los monómeros de las HKs de mamíferos (Aleshin *et al.*, 2000; Nawaz *et al.*, 2018), aunque se ha reportado que algunas isoformas, como la HK-1 de humano, son activas en su estado monomérico, la presencia de diversos sustratos, como la G-6-P, inducen su dimerización (Mulichak *et al.*, 1998).

Cada dominio contiene una lámina β compuesta de 5 hojas plegadas, con varias hélices α alrededor. El sitio activo está formado por una hendidura entre los dos dominios donde se encuentran los residuos que participan en la catálisis (Fig. 13). El valor de la raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) obtenido de la superposición de los carbonos α de los modelos de HK-1 larga y HK-1 corta con el templado es de 0.528 y 0.068 Å, respectivamente, mientras que el RMSD obtenido para la isoforma HK-2 y el templado es de 0.070 Å. Los valores de RMSD obtenidos en los modelos de las estructuras de las isoformas de la HK del camarón son menores a 1.5 Å, lo que indica que las estructuras son similares al templado (Forster, 2002; Sheehan & O'Sullivan, 2011).

Los 51 aminoácidos que no están presentes en la isoforma HK-1 corta se muestran de color verde en la isoforma HK-1 larga, donde se observa que forman tres hélices α y un lazo cercanos al sitio activo ubicado entre los dos dominios (Fig. 13A). Es probable que las estructuras secundarias que forman estos residuos, aunque no se encuentren en el sitio de catálisis, afecten la actividad de la enzima. Sin embargo, es necesario evaluar la repercusión de la presencia o ausencia de estos 51 aminoácidos en las isoformas de la HK-1 del camarón en cuanto a su actividad enzimática, lo que podría realizarse mediante clonación y sobreexpresión de estas isoformas para posteriormente evaluar la actividad de las isoformas recombinantes.

Como se identificó en el alineamiento, las isoformas de la HK del camarón y de otras especies pertenecen a la superfamilia de ATPasas (InterPro: IPR043129) que contienen un dominio estructural, denominado motivo de unión a actina, involucrado en la unión de ATP. En las HKs, se sugiere que la interacción funcional con ATP requerida para la catálisis, y que es mediada por el motivo de unión a actina, involucra la interacción con las regiones N- y C-terminal entre la región de las láminas β de las estructuras (Wilson & Shwab, 1996). Esto tiene sentido, ya que se ha reportado que la región entre los dominios estructurales de la HK, N- y C-terminal son el sitio activo de la enzima donde la unión del ATP es esencial para que se lleve a cabo la reacción.

6.4. Expresión Relativa de las Isoformas de la HK por Tejido

La expresión génica de las isoformas HK-1 total (HK-1 larga y corta) y HK-2 total relativa al gen normalizador L8 se evaluó mediante RT-qPCR en los tejidos de branquias, hepatopáncreas y músculo de camarones del tratamiento de normoxia 0 horas (Fig. 14). Para la HK-1 total, la mayor expresión se detectó en hepatopáncreas ($p < 0.05$), pero entre branquias y músculo no hubo diferencias significativas. La media de la expresión de hepatopáncreas fue aproximadamente 4.2 veces mayor que en branquias y 19.6 veces mayor que en músculo (Fig. 14A), mientras que la expresión de la isoforma HK-2 fue mayor en branquias seguido de hepatopáncreas, siendo significativamente mayor que la expresión en el tejido de músculo ($p < 0.05$) (Fig. 14B). La media de la expresión de HK-2 en branquias fue aproximadamente 2.5 y 4.5 veces que las de hepatopáncreas y músculo, respectivamente.

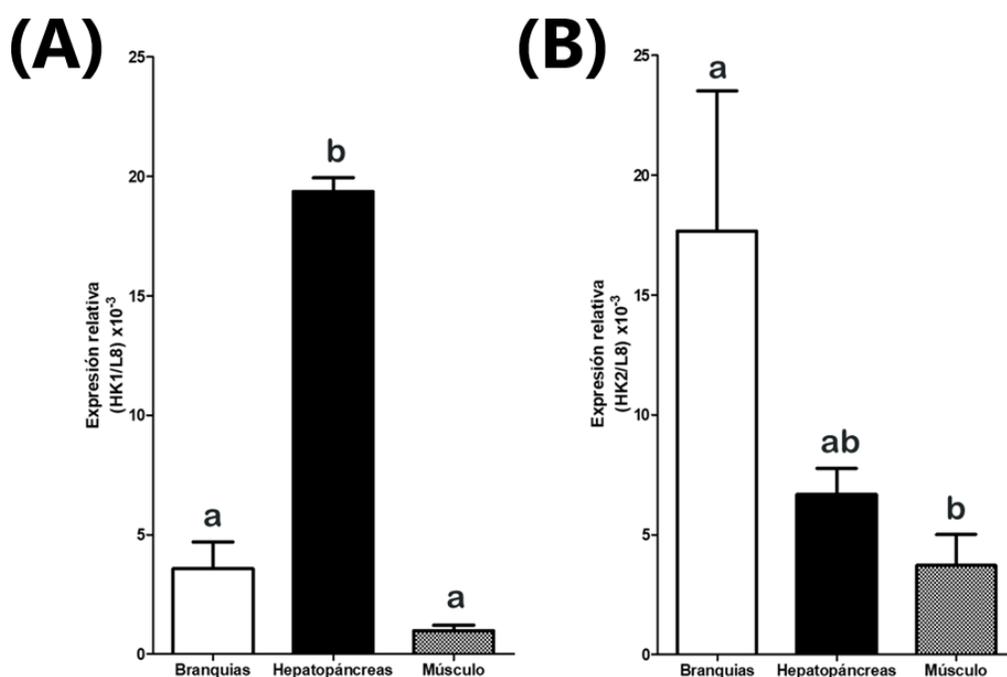


Figura 14. Expresión relativa por tejido de las isoformas de la HK de *L. vannamei* en condiciones de normoxia. (A) Expresión de HK-1 total relativa a L8. (B) Expresión de HK-2 total relativa a L8. La expresión relativa se calculó utilizando el método de $2^{-\Delta Cq}$, donde el ΔCq se calcula a partir de la diferencia entre los valores de Cq de cada HK y de L8. Literales distintas denotan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos ($n = 3-5$) ($p < 0.05$). Los resultados se expresan como media \pm error estándar.

Contrario a lo reportado por Soñanez-Organis *et al.*, (2011) donde la mayor expresión basal de la HK se reportó en tejido de músculo seguida de branquias, en este trabajo la expresión basal en ambas isoformas HK-1 y HK-2 totales fue en los tejidos de hepatopáncreas y branquias, respectivamente. Sin embargo, en ese estudio se utilizaron organismos de diferente talla (15 ± 2 g) a los que se utilizaron en el presente trabajo ($12.84 \text{ g} \pm 1.39 \text{ g}$) lo que podría explicar la diferencia en el nivel de expresión tejido-específica de la isoforma de la HK-1. Es posible también, que los camarones usados en este trabajo y los utilizados por Soñanez-Organis (2011), provengan de poblaciones diferentes, como ha propuesto (Granillo-Luna *et al.*, 2022) para el caso de la PC.

Similar a los resultados obtenidos en este estudio, las isoformas HK-1 y HK-2 en la gallina *Gallus gallus* presentan un patrón de expresión basal tejido-específico, la isoforma HK-1 se expresa principalmente en tejidos de cerebro y corazón, mientras que la HK-2 de *G. gallus* predomina en tejido del músculo esquelético y corazón, sin embargo, esta isoforma tiene una baja expresión en hígado, corazón y riñones (Seki *et al.*, 2005). El patrón de expresión de la isoforma HK-1 de *G. gallus* es similar a lo reportado para las isoformas HK-1 de otras especies como el humano, ratón y pez. Sin embargo, la HK-2 de *G. gallus* presenta un patrón de expresión distinto a las isoformas de mamíferos (González-Alvarez *et al.*, 2009; Heikkinen *et al.*, 2000; Printz *et al.*, 1993; Tsai & Wilson, 1997).

Se ha demostrado que el patrón de expresión de las isoformas de la HK es tejido-específico indicando que las isoformas tienen un rol característico en un órgano en particular de un organismo en cuestión. En mamíferos se ha demostrado que las isoformas más abundantes, HK-I y HK-II, tienen diferentes distribuciones subcelulares (Wilson, 1995). Por ejemplo, en las células hepáticas donde la síntesis de glucógeno es impulsada por la HK-IV en lugar de HK-I, la G-6-P estimula la síntesis de glucógeno al inducir la redistribución de la HK-IV y de la glucógeno sintasa (GS) a la periferia celular (Ferrer *et al.*, 2003). John *et al.*, (2011) demostraron que, en mamíferos, la HK-I permanece fuertemente unida a la mitocondria, mientras que HKII se transloca entre la mitocondria y el citosol en respuesta a la glucosa y G-6-P, sugiriendo que HK-I promueve exclusivamente la glucólisis, mientras que HK-II tiene un papel más complejo, promoviendo la glucólisis cuando se une a la mitocondria y la síntesis de glucógeno cuando se encuentra en el citosol. Además, los autores discuten que la degradación del glucógeno tras la eliminación de la glucosa conduce a la inhibición y disociación de HK-II de las mitocondrias, probablemente mediada por aumentos en la G-6-P derivada del glucógeno. Este puede ser un mecanismo importante por el cual las isoformas

de la HK permiten que las células se adapten a los cambios en las condiciones metabólicas (por ejemplo, los niveles de glucosa) para mantener el equilibrio energético, dirigiendo el destino metabólico de la glucosa entre usos catabólicos (glucólisis) y anabólicos (síntesis de glucógeno y derivación de pentosa fosfato).

Esta situación también se presenta en el camarón blanco, ya que las isoformas HK-1 y HK-2 totales se expresan constitutivamente en los tejidos evaluados, pero son predominantes en hepatopáncreas y branquias, respectivamente. La isoforma HK-1 del camarón podría estar relacionada con las funciones del hepatopáncreas como la absorción de nutrientes, la síntesis de proteínas, el almacenamiento de reservas energéticas, en particular implicada en la síntesis de glucógeno a partir del producto de la reacción catalizada por la HK, la G-6-P (Gibson & Barker, 1979; Sánchez-Paz *et al.*, 2007), mientras que la isoforma HK-2 es predominante en branquias y al ser un órgano altamente aerobio, esta isoforma podría estar implicada en la glucólisis aerobia para la obtención de energía (Henry *et al.*, 2012).

6.5. Efecto de la Hipoxia y Reoxigenación en la Expresión de las Isoformas de la HK

El efecto de la hipoxia y la hipoxia seguida de reoxigenación sobre la expresión de las isoformas HK-1 y HK-2 del camarón blanco se evaluó a las 6 y 12 horas en los tejidos de branquias y hepatopáncreas mediante RT-qPCR. Los tratamientos evaluados fueron normoxia durante 0 horas como control del bioensayo (N0), normoxia por seis horas (N6), hipoxia por seis horas (H6), hipoxia por seis horas más una hora de reoxigenación (R6), normoxia por doce horas (N12), hipoxia por doce horas (H12) e hipoxia por doce horas más una hora de reoxigenación (R12), y se evaluó la expresión de las isoformas de HK-1 y HK-2 en los tejidos de branquias y hepatopáncreas de los mismos camarones.

La expresión de la isoforma HK-1 total relativa al gen que codifica a la proteína ribosomal L8 en respuesta a hipoxia y reoxigenación se muestra en la Figura 15. En el tejido de hepatopáncreas (Fig. 15A) se detectó una disminución en la expresión de la HK-1 estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en los tratamientos N6, H6 y R6 con respecto al control N0, presentando el nivel de expresión más bajo en el tratamiento N12 (aproximadamente 8.5 veces menor que en N0). En los

tratamientos de H12 y R12 la expresión aumentó significativamente ($p < 0.05$) 2.5 y 5.6 veces con respecto al control N12. Sin embargo, no hubo un cambio significativo entre los tratamientos H6 y H12. Mientras, mientras que en branquias (Fig. 15B), la mayor expresión de la HK-1 total también se detectó en el tratamiento control N0. Aunque no se presentaron cambios significativos ($p < 0.05$) debidos a la hipoxia y reoxigenación a las seis horas, sí hubo una disminución estadísticamente significativa en los tratamientos N12 y H12 ($p < 0.05$) con respecto al control N0 de 19.3 y 13.5 veces, respectivamente.

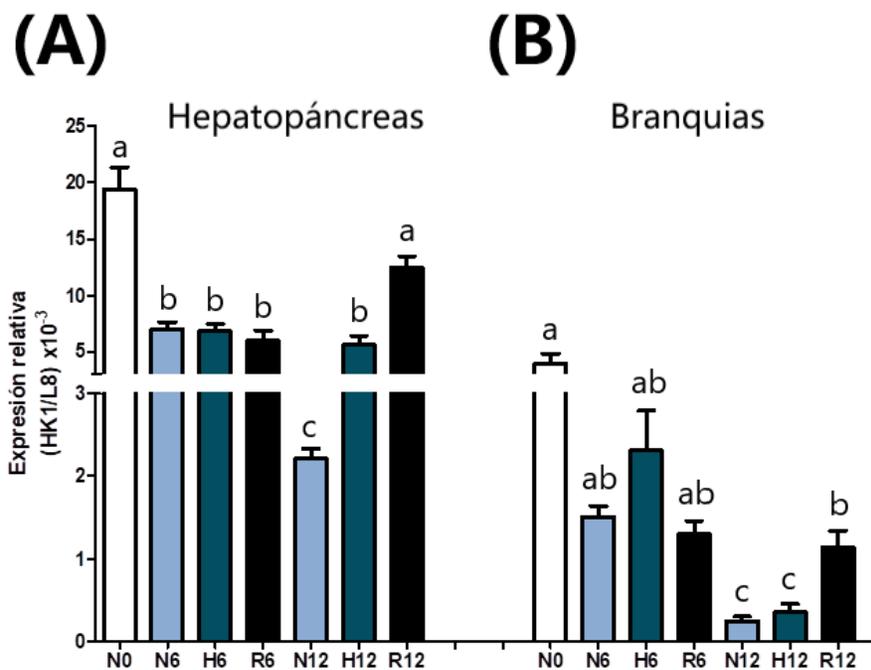


Figura 15. Efecto de la hipoxia y la reoxigenación sobre la expresión relativa de la isoforma HK-1 total de *L. vannamei* en branquias y hepatopáncreas. (A) En hepatopáncreas. (B) En branquias. Las abreviaciones de los tratamientos evaluados son: N0 (Normoxia por 0 h), N6 (Normoxia por 6 h), H6 (Hipoxia por 6 h), R6 (Hipoxia por 6 h + 1 h de Reoxigenación), N12 (Normoxia por 12 h), H12 (Hipoxia por 12 h), R12 (Hipoxia por 12 h + 1 h de Reoxigenación). La expresión relativa se calculó utilizando el método de $2^{-\Delta Cq}$, donde ΔCq es la diferencia entre los valores de Cq de HK y de L8. Literales distintas denotan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos ($n = 4-5$) ($p < 0.05$). Los resultados se expresan como media \pm error estándar.

Por otra parte, también se evaluó la expresión de la HK-2 total en respuesta a la hipoxia y la reoxigenación en los mismos tratamientos y tejidos (Fig. 16). Contrario a la alta expresión basal de HK-1 total en hepatopáncreas, la expresión de HK-2 total en este tejido fue baja y aumentó sin ser

estadísticamente significativa por efecto de los tratamientos N6 y H6, seguido de una disminución en el tratamiento R6 (Fig. 16A). El efecto de los tratamientos N12, H12 y R12 tuvo un comportamiento similar a los tratamientos de seis horas, donde se detectó un aumento en la expresión en N12 y H12 y la disminución en R12 a los niveles de expresión basales (N0). La expresión de la isoforma HK-2 total en branquias (Fig. 16B) disminuyó significativamente ($p < 0.05$) por efecto de los tratamientos N6, H6 y R6, la disminución fue de 2.6, 3.6 y 4.8 veces, respectivamente. Sin embargo, la expresión aumentó a niveles cercanos al basal en el tratamiento de N12, con una disminución significativa en el tratamiento de H12 que posteriormente aumentó en el tratamiento de R12.

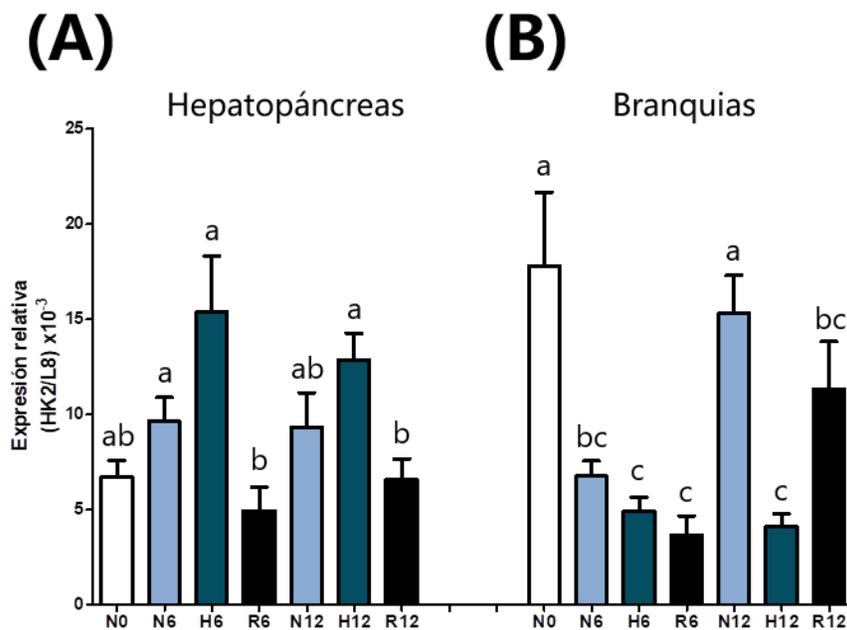


Figura 16. Efecto de la hipoxia y la reoxigenación sobre la expresión relativa de la isoforma HK-2 total de *L. vannamei* en branquias y hepatopáncreas. (A) En hepatopáncreas. (B) En branquias. Las abreviaciones de los tratamientos evaluados son: N0 (Normoxia por 0 h), N6 (Normoxia por 6 h), H6 (Hipoxia por 6 h), R6 (Hipoxia por 6 h + 1 h de Reoxigenación), N12 (Normoxia por 12 h), H12 (Hipoxia por 12 h), R12 (Hipoxia por 12 h + 1 h de Reoxigenación). La expresión relativa se calculó utilizando el método de $2^{-\Delta Cq}$, donde ΔCq es la diferencia entre los valores de Cq de HK y de L8. Literales distintas denotan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos ($n = 4-5$) ($p < 0.05$). Los resultados se expresan como media \pm error estándar.

Tanto en branquias como en hepatopáncreas, hubo una disminución significativa ($p < 0.05$) en la

expresión de la HK-1 en el tratamiento de N6 y N12 (normoxia por seis y doce horas) con respecto al control N0, así como en la expresión de la HK-2 en branquias. Sin embargo, los camarones no estuvieron expuestos a distintos parámetros medio ambientales que pudieran ocasionar el cambio en la expresión de la HK-1, ya que los tratamientos se encontraban en las condiciones controladas, pero los organismos se alimentaron por última vez 24 horas previas al inicio del bioensayo, por lo que los tratamientos N6 y N12 tienen seis y doce horas más de ayuno que el tratamiento N0, respectivamente. Esto podría explicar la disminución de la expresión de las isoformas HK-1 y HK-2 en estos tejidos. Sánchez-Paz *et al.*, (2007) reportaron que el ayuno de 24 hasta 120 h disminuyó el contenido de glucógeno hepatopancreático en el camarón. Esto podría suceder mediante la glucogenólisis, donde se degrada el glucógeno para obtener G-6-P, proceso en donde no participa la HK (porque se obtiene G-6-P y no glucosa para fosforilar) y por ende se presente una disminución en su expresión (Stryer *et al.*, 2013).

Por otro lado, se ha demostrado que la hipoxia es un potente regulador de la expresión génica en diversos organismos aerobios, en particular induce la expresión de los genes que codifican a enzimas glucolíticas (Riddle *et al.*, 2000; Webster, 2003). En mamíferos se ha reportado el cambio en la expresión de las isoformas de la HK inducido por hipoxia de manera diferencial entre los diversos tejidos, como es el caso del tejido pulmonar de humano donde hubo un aumento de la expresión de la isoforma HK-2 aproximadamente 4 veces en respuesta a la hipoxia, pero no tuvo efecto en la expresión de la isoforma HK-1 (Riddle *et al.*, 2000). Aunado a esto, hay evidencia de la regulación transcripcional de la HK vía HIF-1 en diversas especies. La región promotora del gen de la HK-II de humano contiene la región de unión de HIF-1, lo que controla la regulación de la expresión de la HK-II en condiciones de hipoxia (Roberts & Miyamoto, 2015). En el análisis bioinformático de la estructura del gen de la HK-2 de *L. vannamei* se identificó la secuencia consenso para HIF-1 en la región promotora del gen de la HK-2 del camarón (Fig. 4), por lo que se podría hipotetizar que HIF-1 media la regulación transcripcional de este gen para dirigir la respuesta adaptativa al estrés por hipoxia, como se ha demostrado para otras especies.

En crustáceos ha sido menos reportado el efecto de la hipoxia en la expresión de esta enzima. En el molusco marino *L. littorea* se evaluó el estado de fosforilación de las isoformas de la HK, la HK hepática y HK muscular en respuesta a la anoxia. Durante esta condición de nulo oxígeno, la HK hepática se encuentra en un estado de desfosforilación lo que conlleva a un aumento en la afinidad de glucosa, contrario a la respuesta de la HK muscular que conduce a la fosforilación de la enzima y a una posterior disminución a la afinidad de ATP. Esta diferencias en el estado de fosforilación

tejido-específica de las isoformas de la HK indican que durante la anoxia los distintos tejidos presentan diferentes funciones y necesidades en *L. littorea* (Lama *et al.*, 2013). Esto demuestra que en este molusco hay una regulación a nivel postraducciona de isoformas de la HK en respuesta a condiciones de bajo o nulo OD, lo que podría suceder también para las isoformas de la HK del camarón blanco. Por otra parte, en el langostino de río *M. nipponense* se evaluó el efecto de la hipoxia y el silenciamiento de las subunidades α y β de HIF-1 sobre la expresión de la HK (cabe señalar que la HK reportada para *M. nipponense* corresponde a la isoforma HK-2 de *L. vannamei*) (Sun *et al.*, 2017), y demostraron que la hipoxia induce la expresión de la HK en músculo y que esta respuesta es regulada por HIF-1.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la hipoxia tiene un efecto significativo en la expresión de las isoformas de la HK del camarón blanco, como se ha reportado para otros organismos. Soñanez-Organis *et al.*, (2011) reportó un aumento significativo en la expresión de la HK-1 en branquias por efecto de la exposición a hipoxia a un nivel de 1.5 mg de O₂/L durante 1 hora seguida de la restitución a los niveles normales a las 24 horas de hipoxia. Esto concuerda con los resultados obtenidos en este estudio donde la expresión de la HK-1 en branquias aumentó a las seis horas de hipoxia con respecto al control N6, además en el tratamiento R6 de seis horas de hipoxia más una hora de reoxigenación los niveles de expresión regresaron a los basales. Esto implica que la hora de reoxigenación después de la exposición a la hipoxia es suficiente para que el metabolismo energético relacionado con la expresión de esta enzima se estabilice en el camarón. Sin embargo, la exposición a la hipoxia durante doce horas en branquias no tuvo un efecto significativo en la expresión de la HK-1 con respecto al control de N12, pero sí hubo un aumento significativo por la reoxigenación de una hora. A pesar de que los niveles de expresión de la HK-1 son distintos en los dos tejidos, siendo significativamente mayor en hepatopáncreas, la respuesta a la hipoxia seguida de reoxigenación en los niveles evaluados es similar.

Durante la exposición a la hipoxia por seis horas e hipoxia seis horas más una hora de reoxigenación, en la expresión de la HK-2 no se presentan cambios significativos en ninguno de los dos tejidos. Asimismo, el patrón de expresión de la HK-2 en los dos tejidos es similar en los tratamientos de doce horas, donde la hipoxia e hipoxia con reoxigenación aumenta significativamente. Similar a lo observado en otros organismos, la expresión de las isoformas de la HK se ve afectada de manera tejido-específica en respuesta a la hipoxia y reoxigenación en el camarón blanco.

7. CONCLUSIONES

En el presente estudio se amplificaron y clonaron dos secuencias de la isoforma HK-1 de *L. vannamei* denominadas HK-1 larga y HK-1 corta, así como una secuencia de la isoforma HK-2 identificada como variante X3 en el genoma y se caracterizaron sus secuencias deducidas de aminoácidos mediante análisis bioinformáticos. La isoforma HK-1 corta presenta una delección de 51 aminoácidos que sí están presentes en la isoforma HK-1 larga del camarón y en el resto de las secuencias alineadas de otras especies. Las isoformas de la HK del camarón presentan un alto porcentaje de identidad con proteínas homólogas de otros organismos, así como dominios altamente conservados entre especies, con los residuos importantes para la catálisis reportados para otros organismos. Además, las isoformas de la HK del camarón poseen un peso molecular similar a las enzimas de otros invertebrados y el análisis filogenético las ubicó en el mismo clado de las HKs de crustáceos separadas de las enzimas de vertebrados. Las estructuras terciarias de las isoformas de la HK del camarón se pliegan de manera similar a las HKs de mamíferos.

La evaluación de la expresión relativa de las isoformas HK-1 y HK-2 totales en camarones en condiciones normales indicó que las isoformas se expresan constitutivamente en los tejidos evaluados, predominando HK-1 en hepatopáncreas y HK-2 en branquias, sugiriendo que su expresión es tejido-específica. Además, la exposición a la hipoxia disminuyó la expresión de la HK-1 total en hepatopáncreas y branquias, pero la reoxigenación restauró la expresión a los niveles detectados en normoxia. Por otra parte, la expresión de HK-2 total cambió diferencialmente en ambos tejidos en respuesta a la hipoxia. En hepatopáncreas, la expresión de HK-2 aumentó sin ser estadísticamente significativa por efecto de la hipoxia pero hubo una disminución significativa debido a la reoxigenación. Por el contrario, en branquias, la expresión de HK-2 disminuyó significativamente por efecto de la hipoxia. Estos resultados indican que la expresión de las isoformas de HK de camarón responde a la hipoxia y la reoxigenación, de una manera tejido-específica. Esto podría indicar que las isoformas tienen un rol característico con funciones específicas en los órganos del camarón.

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda dar continuidad al presente trabajo con el fin de mejorar el entendimiento del mecanismo de regulación de las isoformas de la HK del camarón *Litopenaeus vannamei* en respuesta a la hipoxia y la reoxigenación. Además, es recomendable caracterizar los genes de las HK identificadas para el camarón para dilucidar la generación de las variantes de transcrito derivadas de un mismo gen, así como para determinar los elementos presentes en la región promotora que den indicios de su regulación transcripcional. Asimismo, es necesario realizar estudios de actividad enzimática de la HK en las condiciones estudiadas en este proyecto para comparar la respuesta a nivel transcripcional y post-traducciona l de esta enzima.

9. REFERENCIAS

- Abnous, K., & Storey, K. B. (2008). Skeletal muscle hexokinase: Regulation in mammalian hibernation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 319(1–2), 41–50.
- Aleshin, A. E., Kirby, C., Liu, X., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Fromm, H. J., & Honzatko, R. B. (2000). Crystal structures of mutant monomeric hexokinase I reveal multiple ADP binding sites and conformational changes relevant to allosteric regulation. *Journal of Molecular Biology*, 296(4), 1001–1015.
- Bondad-Reantaso, M. G., Subasinghe, R. P., Josupeit, H., Cai, J., & Zhou, X. (2012). The role of crustacean fisheries and aquaculture in global food security: Past, present and future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(2), 158–165.
- Breitburg, D., Levin, L. A., Oschlies, A., Grégoire, M., Chavez, F. P., Conley, D. J., Garçon, V., Gilbert, D., Gutiérrez, D., Isensee, K., Jacinto, G. S., Limburg, K. E., Montes, I., Naqvi, S. W. A., Pitcher, G. C., Rabalais, N. N., Roman, M. R., Rose, K. A., Seibel, B. A., Zhang, J. (2018). Declining oxygen in the global ocean and coastal waters. *Science*, 359(6371).
- Camacho-Jiménez, L., Leyva-Carrillo, L., Peregrino-Uriarte, A. B., Duarte-Gutiérrez, J. L., Tresguerres, M., & Yepiz-Plascencia, G. (2019). Regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by hypoxia inducible factor 1 in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* during hypoxia and reoxygenation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 56–65.
- Camacho-Jiménez, L., Peregrino-Uriarte, A. B., Martínez-Quintana, J. A., & Yepiz-Plascencia, G. (2018). The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Molecular cloning, characterization and expression during hypoxia. *Marine Environmental Research*, 138(April), 65–75.
- Cao, R., Zhang, T., Li, X., Zhao, Y., Wang, Q., Yang, D., Qu, Y., Liu, H., Dong, Z., & Zhao, J. (2019). Seawater acidification increases copper toxicity: A multi-biomarker approach with a key marine invertebrate, the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology*, 210, 167–178.
- Cárdenas, M. L., Cornish-Bowden, A., & Ureta, T. (1998). Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1401(3), 242–264.
- Carreño Mejía, A. (2009). Influencia del estrés por hipertermia a corto plazo sobre índices fisiológicos, inmunológicos y celulares en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de México. México, D.F.
- Childers, C. L., & Storey, K. B. (2016). Post-translational Regulation of Hexokinase Function and Protein Stability in the Aestivating Frog *Xenopus laevis*. *The Protein Journal*, 35(1), 61–71.
- Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. (2017). Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca Publicación 2017. 300. www.conapesca.gob.mx
- Cota-Ruiz, K., Leyva-Carrillo, L., Peregrino-Uriarte, A. B., Valenzuela-Soto, E. M., Gollas-Galván, T., Gómez-Jiménez, S., Hernández, J., & Yepiz-Plascencia, G. (2016). Role of HIF-

1 on phosphofructokinase and fructose 1, 6-bisphosphatase expression during hypoxia in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology*, 198, 1–7.

- Cota-Ruiz, K., Peregrino-Uriarte, A. B., Felix-Portillo, M., Martínez-Quintana, J. A., & Yepiz-Plascencia, G. (2015). Expression of fructose 1,6-bisphosphatase and phosphofructokinase is induced in hepatopancreas of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* by hypoxia. *Marine Environmental Research*, 106(1), 1–9.
- Dawson, N. J., & Storey, K. B. (2012). Regulation of tail muscle hexokinase in the anoxia-tolerant freshwater crayfish, *Orconectes virilis*. *HOAJ Biology*, 1(1), 1.
- Derouiche, A., Cousin, C., & Mijakovic, I. (2012). Protein phosphorylation from the perspective of systems biology. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(4), 585–590.
- Diaz, R. J., & Rosenberg, R. (2008). Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science*, 321(5891), 926–929.
- Dieni, C. A., & Storey, K. B. (2011). Regulation of hexokinase by reversible phosphorylation in skeletal muscle of a freeze-tolerant frog. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 159(4), 236–243.
- FAO. (2018). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible.
- Ferrer, J. C., Favre, C., Gomis, R. R., Fernández-Novell, J. M., García-Rocha, M., De La Iglesia, N., Cid, E., & Guinovart, J. J. (2003). Control of glycogen deposition. *FEBS Letters*, 546(1), 127–132.
- Forster, M. J. (2002). Molecular modelling in structural biology. *Micron*, 33(4), 365–384.
- Fothergill-Gilmore, L. A., & Michels, P. A. M. (1993). Evolution of glycolysis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 59(2), 105–235.
- Ghaffari, N., Sanchez-Flores, A., Doan, R., Garcia-Orozco, K. D., Chen, P. L., Ochoa-Leyva, A., Lopez-Zavala, A. A., Carrasco, J. S., Hong, C., Briebe, L. G., Rudiño-Piñera, E., Blood, P. D., Sawyer, J. E., Johnson, C. D., Dindot, S. V., Sotelo-Mundo, R. R., & Criscitiello, M. F. (2014). Novel transcriptome assembly and improved annotation of the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), a dominant crustacean in global seafood mariculture. *Scientific Reports*, 4(November).
- Gibson, R., & Barker, P. L. (1979). The decapod hepatopancreas. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 17, 285–346. [Ocaenogr Mar Biol Ann Rev The decapod hepatopancreas Gibson Barker 79.pdf](#)
- Gillett, R. (2008). Global study of shrimp fisheries. In *FAO Fisheries Technical Paper: Vol. No. 475*. (Issue Rome, FAO., p. 331 p.).
- Gobler, C. J., & Baumann, H. (2016). Hypoxia and acidification in ocean ecosystems: Coupled dynamics and effects on marine life. *Biology Letters*, 12(5).
- González-Alvarez, R., Ortega-Cuellar, D., Hernández-Mendoza, A., Moreno-Arriola, E., Villaseñor-Mendoza, K., Gálvez-Mariscal, A., Pérez-Cruz, M. E., Morales-Salas, I., & Velázquez-Arellano, A. (2009). The hexokinase gene family in the zebrafish: Structure, expression, functional and phylogenetic analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology*

- B Biochemistry and Molecular Biology, 152(2), 189–195.

- Gorr, T. A., Gassmann, M., & Wappner, P. (2006). Sensing and responding to hypoxia via HIF in model invertebrates. *Journal of Insect Physiology*, 52(4), 349–364.
- Gorr, T. A., Wichmann, D., Hu, J., Hermes-Lina, A. F., Welker, A. F., Terwilliger, N., Wren, J. F., Viney, M., Morris, S., Nilsson, G. E., Deten, A., Soliz, J., & Gassmann, M. (2010). Hypoxia Tolerance in Animals: Biology and Application. *Physiological and Biochemical Zoology*, 83(5), 733–752.
- Granillo-Luna, O. N., Hernandez-Aguirre, L. E., Peregrino-Uriarte, A. B., Duarte-Gutierrez, J., Contreras-Vergara, C. A., Gollas-Galvan, T., & Yepiz-Plascencia, G. (2022). The anaplerotic pyruvate carboxylase from white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Gene structure, molecular characterization, protein modelling and expression during hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology*, 269(February), 111212.
- Han, S. Y., Wang, B. J., Liu, M., Wang, M. Q., Jiang, K. Y., Qi, C. C., & Wang, L. (2017). Effect of cyclic serious/medium hypoxia stress on the survival, growth performance and resistance against vibrio parahemolyticus of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Invertebrate Survival Journal*, 14, 259–270.
- Hantzidiamantis, P. J., & Lappin, S. L. (2021). *Physiology, Glucose*. StatPearls Publishing.
- Heikkinen, S., Suppola, S., Malkki, M., Deeb, S. S., Jänne, J., & Laakso, M. (2000). Mouse hexokinase II gene: Structure, cDNA, promoter analysis, and expression pattern. *Mammalian Genome*, 11(2), 91–96.
- Henry, R. P., Lucu, Č., Onken, H., & Weihrauch, D. (2012). Multiple functions of the crustacean gill: Osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Frontiers in Physiology*, 3 NOV(November), 1–33.
- Holden, C. P., & Storey, K. B. (1997). Second messenger and cAMP-dependent protein kinase responses to dehydration and anoxia stresses in frogs. *Journal of Comparative Physiology - B Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 167(4), 305–312.
- Irwin, D. M., & Tan, H. (2008). Molecular evolution of the vertebrate hexokinase gene family: Identification of a conserved fifth vertebrate hexokinase gene. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D*, 3, 96–107.
- Jayakumar, P. C., Shouche, Y. S., & Patole, M. S. (2001). Cloning of two hexokinase isoenzyme sequences from *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(12), 1165–1171.
- Keeling, R. F., Körtzinger, A., & Gruber, N. (2010). Ocean deoxygenation in a warming world. *Annual Review of Marine Science*, 2(1), 199–229.
- Khan, M. W., Ding, X., Cotler, S. J., Clarke, M., & Layden, B. T. (2018). Studies on the Tissue Localization of HKDC1, a Putative Novel Fifth Hexokinase, in Humans. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 66(5), 385–392.
- Kuser, P. R., Krauchenco, S., Antunes, O. A. C., & Polikarpov, I. (2000). The high resolution crystal structure of yeast hexokinase PII with the correct primary sequence provides new insights into its mechanism of action. *Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20814–

20821.

- Lama, J. L., Bell, R. A. V., & Storey, K. B. (2013). Hexokinase regulation in the hepatopancreas and foot muscle of the anoxia-tolerant marine mollusc, *Littorina littorea*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 166(1), 109–116.
- Lauer, M. M. H., De Oliveira, C. B., Yano, N. L. I., & Bianchini, A. (2012). Copper effects on key metabolic enzymes and mitochondrial membrane potential in gills of the estuarine crab *Neohelice granulata* at different salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 156(3–4), 140–147.
- Lim, P. S., Sutton, C. R., & Rao, S. (2015). Protein kinase C in the immune system: From signalling to chromatin regulation. *Immunology*, 146(4), 508–522.
- Martínez-Córdova, L., Villareal, C. H., & Cortés, J. E. (1999). Capítulo 1: Biología del camarón. Cultivo de camarones peneidos, principios y prácticas (pp. 1–20). A.G.T. Editor, S. A.
- Martínez-Quintana, J. A., Kikuta, S., Felix-Portillo, M., Peregrino-Uriarte, A. B., & Yepiz-Plascencia, G. (2015). A novel functional glucose transporter in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* -LvGLUT2- is up-regulated during hypoxia in hepatopancreas. *Marine Environmental Research*, 112, 61–67.
- Martínez-Quintana, J. A., Peregrino-Uriarte, A. B., Gollas-Galván, T., Gómez-Jiménez, S., & Yepiz-Plascencia, G. (2014). The glucose transporter 1 -GLUT1- from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* is up-regulated during hypoxia. *Molecular Biology Reports*, 41, 7885–7898.
- Martins de Lima, T., Maia Nery, L. E., Everton Maciel, F., Ngo -Vu, H., Kozma, M. T., & Derby, C. D. (2021). Oxygen sensing in crustaceans: functions and mechanisms. *Journal of Comparative Physiology A*, 207(1), 1–15.
- Matschinsky, F. M., & Wilson, D. F. (2019). The Central Role of Glucokinase in Glucose Homeostasis: A Perspective 50 Years After Demonstrating the Presence of the Enzyme in Islets of Langerhans. *Frontiers in Physiology*, 10(March), 1–15.
- Melkonian, E. A., & Schury, M. P. (2021). *Biochemistry, Anaerobic Glycolysis* (In: StatPearls (ed.)). StatPearls Publishing.
- Mulichak, A. M., Wilson, J. E., Padmanabhan, K., & Michael Garavito, R. (1998). The structure of mammalian hexokinase-1. *Nature Structural Biology*, 5(7 SUPPL.), 555–560.
- Nawaz, M. H., Ferreira, J. C., Nedyalkova, L., Zhu, H., Carrasco-López, C., Kirmizialtin, S., & Rabeh, W. M. (2018). The catalytic inactivation of the N-half of human hexokinase 2 and structural and biochemical characterization of its mitochondrial conformation. *Bioscience Reports*, 38(1).
- Pearson, W. R. (2013). An introduction to sequence similarity (“homology”) searching. *Current Protocols in Bioinformatics*.
- Pérez-Rostro, C. I., Racotta, I. S., & Ibarra, A. M. (2004). Decreased genetic variation in metabolic variables of *Litopenaeus vannamei* shrimp after exposure to acute hypoxia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 302(2), 189–200.
- Printz, R. L., Koch, S., Potter, L. R., O’Doherty, R. M., Tiesinga, J. J., Moritz, S., & Granner, D. K. (1993). Hexokinase II mRNA and gene structure, regulation by insulin, and evolution.

Journal of Biological Chemistry, 268(7), 5209–5219.

- Racotta, I. S., Palacios, E., & Méndez, L. (2002). Metabolic responses to short and long-term exposure to hypoxia in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 35(4), 269–275.
- Rajas, F., Gautier-Stein, A., & Mithieux, G. (2019). Glucose-6 phosphate, A central hub for liver carbohydrate metabolism. *Metabolites*, 9(12), 1–14.
- Reyes-Ramos, C. A., Peregrino-Uriarte, A. B., Cota-Ruiz, K., Valenzuela-Soto, E. M., Leyva-Carrillo, L., & Yepiz-Plascencia, G. (2018). Phosphoenolpyruvate carboxykinase cytosolic and mitochondrial isoforms are expressed and active during hypoxia in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology*, 226(July), 1–9.
- Riddle, S. R., Ahmad, A., Ahmad, S., Deeb, S. S., Malkki, M., Schneider, B. K., Allen, C. B., White, C. W., Suzette, R., Ahmad, A., Ahmad, S., Deeb, S. S., Malkki, M., Schneider, B. K., Allen, B., White, C. W., & Physiol, A. J. (2000). Hypoxia induces hexokinase II gene expression in human lung cell line A549. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 278(2), L407–L416.
- Roberts, D. J., & Miyamoto, S. (2015). Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Akting on mitochondria and TORCing to autophagy. *Cell Death and Differentiation*, 22(2), 248–257.
- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Hernández-López, J., Muhlia-Almazán, A., & Yepiz-Plascencia, G. (2007). Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 340, 184–193.
- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Muhlia-Almazán, A., Peregrino-Uriarte, A. B., Hernández-López, J., & Yepiz-Plascencia, G. (2006). Usage of energy reserves in crustaceans during starvation: Status and future directions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36, 241–249.
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108.
- Seibel, B. A. (2011). Critical oxygen levels and metabolic suppression in oceanic oxygen minimum zones. *Journal of Experimental Biology*, 214(2), 326–336.
- Seki, Y., Sato, K., Kono, T., & Akiba, Y. (2005). Cloning and gene expression of hexokinase I and II in the chicken skeletal muscle. *Animal Science Journal*, 76(5), 491–497.
- Semenza, G. L. (1996). Transcriptional regulation by hypoxia-inducible factor 1: Molecular mechanisms of oxygen homeostasis. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 6(5), 151–157.
- Semenza, G. L. (1998). Hypoxia-inducible factor 1 and the molecular physiology of oxygen homeostasis. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 131(3), 207–214.
- Sheehan, D., & O’Sullivan, S. (2011). Online homology modeling as a means of bridging the sequence-structure gap. *Bioengineered Bugs*, 2(6).
- Soñanez-Organis, J. G., Peregrino-Uriarte, A. B., Gómez-Jiménez, S., López-Zavala, A., Forman, H. J., & Yepiz-Plascencia, G. (2009). Molecular characterization of hypoxia inducible factor-

- 1 (HIF-1) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and tissue-specific expression under hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 150(3), 395–405.
- Soñanez-Organis, J. G., Peregrino-Urriarte, A. B., Sotelo-Mundo, R. R., Forman, H. J., & Yepiz-Plascencia, G. (2011). Hexokinase from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: cDNA sequence, structural protein model and regulation via HIF-1 in response to hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 158(3), 242–249.
- Soñanez-Organis, J. G., Rodríguez-Armenta, M., Leal-Rubio, B., Peregrino-Urriarte, A. B., Gómez-Jiménez, S., & Yepiz-Plascencia, G. (2012). Alternative splicing generates two lactate dehydrogenase subunits differentially expressed during hypoxia via HIF-1 in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Biochimie*, 94(5), 1250–1260.
- Stetten, M., & Goldsmith, P. K. (1981). Two Hexokinases of *Homarus americanus* (Lobster), one having great affinity for mannose and fructose and low affinity for glucose. 657, 468–481.
- Stryer, L., Berg, J. M., Tymoczko, J. L. (2013). *Bioquímica* (7^o). Reverté.
- Sun, S., Xuan, F., Fu, H., Zhu, J., & Ge, X. (2017). Molecular cloning and functional characterization of a hexokinase from the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* in response to hypoxia. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6).
- Taylor, S. S., Yang, J., Wu, J., Haste, N. M., Radzio-Andzelm, E., & Anand, G. (2004). PKA: A portrait of protein kinase dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1697(1–2), 259–269.
- Trasviña-Arenas, C. H., García-Triana, A., Peregrino-Urriarte, A. B., & Yepiz-Plascencia, G. (2013). White shrimp *Litopenaeus vannamei* catalase: Gene structure, expression and activity under hypoxia and reoxygenation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology*, 164(1), 44–52.
- Tsai, H. J., & Wilson, J. E. (1997). Functional organization of mammalian hexokinases: Characterization of the rat type III isozyme and its chimeric forms, constructed with the N- and C-terminal halves of the type I and type II isozymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 338(2), 183–192.
- Ulaje, S. A., Rojo-Arreola, L., Lluch-Cota, S. E., Ascencio, F., Cruz-Hernández, P., & Sicard, M. T. (2019). Gene expression and energetic metabolism changes in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to short-term hypoxia. *Aquaculture Research*, 50(4), 994–1004.
- Ureta, T., Medina, C., Preller, A. (1987). The evolution of hexokinases. *Archivos de Biología y Medicina Experimentales*, 20(3–4), 343–357.
- Vaquer-Sunyer, R., & Duarte, C. M. (2008). Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(40), 15452–15457.
- Webster, K. A. (2003). Evolution of the coordinate regulation of glycolytic enzyme genes by hypoxia. *The Journal of Experimental Biology*, 206(17), 2911–2922.
- Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The Stress Response in Fish. *Physiological Reviews*, 77(3), 591–

625.

Wilson, J., & Shwab, D. (1996). Functional interaction of hexokinase with ATP requires participation by both small and large lobes of the enzyme: implications for other proteins using the actin fold as a nucleotide binding motif. *The FASEB Journal*, 10.

Wilson, John E. (1995). Hexokinases. Department of Biochemistry, Michigan State University.

Wilson, John E. (2003). Isozymes of mammalian hexokinase: Structure, subcellular localization and metabolic function. *Journal of Experimental Biology*, 206(12), 2049–2057.

Wu, R. S. S. (2002). Hypoxia: From molecular responses to ecosystem responses. *Marine Pollution Bulletin*, 45(1–12), 35–45.

Zhang, X., Yuan, J., Sun, Y., Li, S., Gao, Y., Yu, Y., Liu, C., Wang, Q., Lv, X., Zhang, X., Ma, K. Y., Wang, X., Lin, W., Wang, L., Zhu, X., Zhang, C., Zhang, J., Jin, S., Yu, K., Xiang, J. (2019). Penaeid shrimp genome provides insights into benthic adaptation and frequent molting. *Nature Communications*, 10(1).