



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

**EFFECTO DEL ESTRÉS POR HIPOXIA, REOXIGENACIÓN Y
TEMPERATURA ALTA EN LA CONCENTRACIÓN DE
PERÓXIDO DE HIDRÓGENO, ACTIVIDAD Y EXPRESIÓN DE
CATALASA EN *Litopenaeus vannamei***

Por:

DALIA GUADALUPE CRUZ MORENO

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

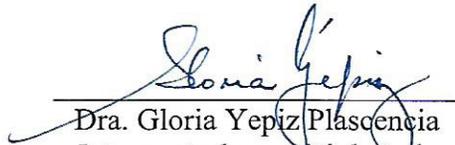
MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Dalia Guadalupe Cruz Moreno, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



M.C. Alma Beatriz Peregrino Uriarte
Directora de tesis



Dra. Gloria Yepiz Plascencia
Integrante de comité de tesis



Dra. Laura Camacho Jiménez
Integrante de comité de tesis



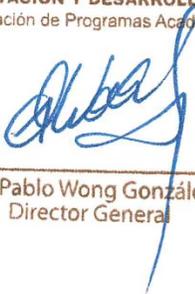
Dra. Idania Emedith Quintero Reyes
Integrante de comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Efecto del Estrés por Hipoxia, Reoxigenación y Temperatura Alta en la Concentración de Peróxido de Hidrógeno, Actividad y Expresión de Catalasa en *Litopenaeus vannamei*” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Dalia Guadalupe Cruz Moreno, 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 manuscrito en cuestión 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

A CONACYT por el financiamiento otorgado a través de la beca de posgrado para la realización de mis estudios de maestría.

Agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. por las facilidades otorgadas para llevar a cabo este proyecto y por permitirme desarrollarme académica, profesional y personalmente.

Al proyecto PN2017/4869 aprobado a la Dra. Gloria Yepiz Plascencia que financió esta investigación.

A mi directora, M.C. Alma Beatriz Peregrino Uriarte, por acompañarme en este camino de trabajo y aprendizaje; por su confianza, guía, comprensión y paciencia.

A la Dra. Gloria Yepiz Plascencia, le agradezco infinitamente por darme la confianza de integrarme al Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica, por sus consejos y exigencia.

A la Dra. Laura Camacho Jiménez, por todos los comentarios que ayudaron a enriquecer este trabajo y su invaluable amistad.

A la Dra. Idania E. Quintero Reyes, por haber alimentado mi curiosidad por la ciencia, por su consejo, guía y confianza.

A la M.C. Lilia Leyva Carrillo, por su interés por facilitarme el aprendizaje y por su calidez humana.

Agradezco a mis compañeros y amigos del equipazo: M.C. Paulina Estrada, Biól. Omar Granillo, M.C. Estefany Hernández, M.C. Ricardo González, M.C. Jorge Duarte, Dra. Laura Camacho, cDra.

Dahlia Nuñez y M.C. Carlos Reyes. Por la compañía, las risas, las pláticas tontas y las ñoñerías del diario.

A mis amigos: María Alejandra Ospina, Estefany Chavarria, Josep Virgo, Isabel Clark, Miguel Camacho, Enis García, Ezequiel Hernández, Carlos Montalvo y Jimena Herrera. A cada uno, por el cariño, el apoyo, el aprendizaje, las risas y hasta los disgustos.

A mi tía Norma Rivera, por abrirme las puertas de su casa cuando más lo necesité, por su cariño y comprensión.

A Marco Mercado, Daniel Clark, Horacio Coronado, Manuel Huerta, Gabriela Valdez, Ana Gaby Salguero y Dinorah Murrieta. Por los años de amistad.

DEDICATORIA

Con infinito amor:

A mis padres:

Hortencia Moreno y Manuel Francisco Cruz Higuera.

Y a mis hermanos:

Manuel Cruz y Azalea Cruz.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE CUADROS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES	15
2.1. Condiciones Ambientales en el Cultivo del Camarón Blanco	15
2.2. Cambio Climático, Temperatura y Disponibilidad de Oxígeno	17
2.3. La Hipoxia en Ecosistemas Acuáticos.....	19
2.3.1. Mecanismos de Adaptación a la Hipoxia en Crustáceos.	20
2.4. Tolerancia y Respuesta a la Temperatura en Crustáceos	21
2.4.1. El Estrés Térmico en Crustáceos.	23
2.5. Especies Reactivas de Oxígeno	24
2.6. Implicaciones Biológicas del Estrés Oxidativo	26
2.7. Enzimas Antioxidantes	28
2.8. Características Generales de Catalasa	31
3. HIPÓTESIS	34
4. OBJETIVOS	35
4.1. Objetivo General.....	35
4.2. Objetivos Específicos	35
5. MATERIALES Y MÉTODOS	36
5.1. Bioensayo de Temperatura Alta, Hipoxia y Reoxigenación	36
5.2. Evaluación de la Expresión Relativa de Catalasa por PCR en Tiempo Real	37
5.2.1. Extracción de RNA total y Síntesis de cDNA.....	38
5.2.2. Cuantificación de transcritos por RT-qPCR.....	39
5.3. Ensayo de Actividad de Catalasa.....	39
5.3.1. Fraccionamiento Celular de Tejidos de Branquias y Hepatopáncreas.	39
5.3.2. Cuantificación de la Actividad Específica de Catalasa.	40
5.4. Cuantificación del H ₂ O ₂ por el Método de Rojo de Fenol-Peroxidasa.	41
5.5. Análisis Estadístico.....	42
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
6.1. Expresión Relativa de Catalasa en Branquias y Hepatopáncreas.....	43

CONTENIDO (Continuación)

6.2. Actividad de Catalasa en Branquias y Hepatopáncreas y su Relación de la Concentración de H ₂ O ₂	45
7. CONCLUSIONES	51
8. REFERENCIAS	53

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Cambio en la temperatura global relativa al periodo 1951-1980.....	18
2	Producción de ROS en la mitocondria.....	25
3	Expresión relativa de catalasa en branquias y hepatopáncreas.....	46
4	Actividad de catalasa en branquias y hepatopáncreas.....	49
5	Concentración de H ₂ O ₂ en hepatopáncreas.....	50

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Reacciones de formación del radical hidroxilo.....	26
2	Producción de ROS en condiciones de estrés ambiental en camarones peneidos.....	28
3	Principales enzimas antioxidantes y las reacciones que catalizan.....	30
4	Respuestas de catalasa a distintos tipos de estrés en camarones peneidos.....	33
5	Oligonucleótidos específicos usados en RT-qPCR.....	40

RESUMEN

El camarón blanco *Litopenaeus vannamei* es una especie de gran importancia comercial en México, sin embargo, la producción de este peneido ha sido afectada por el calentamiento global que conlleva a la exposición a temperaturas elevadas y a periodos de hipoxia y reoxigenación que afectan su crecimiento, estado de salud y supervivencia, generando pérdidas económicas. Estos estresores ambientales promueven la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), como el H_2O_2 , que contribuyen al estrés oxidativo. Entre las principales respuestas al estrés oxidativo se encuentra la catalasa (CAT), una enzima clave en la defensa antioxidante que lleva a cabo la eliminación del H_2O_2 . El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto que ejercen la temperatura alta (35 vs 28 °C), la concentración de oxígeno disuelto (normoxia, hipoxia por 24 h e hipoxia por 24 h más 1 h de reoxigenación) y sus interacciones en la expresión génica de CAT, su actividad y la concentración de H_2O_2 en las branquias y el hepatopáncreas de camarón blanco. La expresión relativa de CAT se evaluó por RT-qPCR, la actividad enzimática se cuantificó aprovechando la capacidad peroxidática de la CAT y la concentración de H_2O_2 con la técnica de rojo de fenol-peroxidasa de rábano. Los resultados obtenidos revelan aumentos en la expresión de CAT en branquias por la interacción temperatura alta-reoxigenación, mientras que en hepatopáncreas no se encontraron efectos significativos de los tratamientos. En branquias la temperatura alta, la hipoxia, la reoxigenación o sus interacciones no ejercieron efecto en la actividad de CAT. En hepatopáncreas se detectó un aumento en la actividad por efecto de la temperatura alta en todos los niveles de oxígeno, pero no se encontraron diferencias significativas en la concentración de H_2O_2 .

Palabras clave: ROS, catalasa, hipoxia, temperatura alta, estrés oxidativo.

ABSTRACT

The whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* is an very important commercial species in Mexico, however, the production of this peneid has been affected by global warming that leads to exposure to high temperatures and periods of hypoxia and reoxygenate that affect its growth, health and survival, resulting in economic losses. These environmental stressors promote the formation of radical oxygen species (ROS), as H₂O₂, which contributes to oxidative stress. Catalase is one of the main responses to oxidative stress, a key enzyme which carries out the elimination of H₂O₂. The objective of this work was evaluate the effect of high temperature (35 vs 28 °C), dissolved oxygen concentration (normoxia, hypoxia for 24 and hypoxia for 24 h and 1 h of reoxygenation) and their interactions in gene expression, CAT activity and H₂O₂ concentration in gills and hepatopancreas of the whiteleg shrimp. The relative expression of CAT was evaluated with RT-qPCR, the enzymatic activity was quantified using the peroxidatic activity of CAT and the concentration of H₂O₂ with the phenol red-horseradish peroxidase method. The results obtained reveal increases in the expression of CAT in gills by the effect of the interaction of high temperature-reoxygenation, while in hepatopancreas there are no effects of the treatments. In gills high temperature, hypoxia, reoxygenation or their interactions had no effect on the CAT activity. In hepatopancreas an increase in the catalase activity in response to temperature in all the oxygen levels was detected, but the H₂O₂ concentration had no differences.

Key words: ROS, catalase, hypoxia, high temperature, oxidative stress.

1. INTRODUCCIÓN

Litopenaeus vannamei es una especie de camarón originaria de la costa oriental del Océano Pacífico en el territorio comprendido entre México y Perú, donde las aguas poseen temperaturas con medias de 20 °C durante todo el año (Cobo, 2016). El camarón blanco es conocido por su alto rendimiento en producción y rentabilidad económica en el mercado internacional, al contribuir con 18 billones de dólares en promedio en el mercado mundial anualmente. En México la producción del camarón *L. vannamei* registrada en el año 2016 fue de 211,096 toneladas, otorgándole el noveno lugar en la industria camaronícola del mundo; asimismo el camarón es el segundo producto pesquero de mayor importancia en el país. El estado de Sonora es el segundo estado más importante en la producción camaronícola nacional, ya que en 2016 aportó el 28% con un total de 59,098 toneladas, solo superada por el estado de Sinaloa que aportó un 46.9% (Gainza et al., 2017; SAGARPA, 2017).

Por efecto del cambio climático, las zonas donde se desarrolla el cultivo de camarón se ven expuestas a condiciones ambientales que son generadoras potenciales de estrés, por ejemplo, fluctuaciones de temperatura y concentraciones de oxígeno disuelto en agua (OD) los cuales afectan el crecimiento, el estado de salud y la supervivencia (Zhou et al., 2010). Ambos factores están muy relacionados, ya que el aumento de la temperatura ambiental promueve la disminución del OD del medio y en conjunto aumentan el estrés en *L. vannamei*, que se traduce en un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Aunque en condiciones fisiológicas normales los organismos aerobios deben lidiar con la producción ROS originados en la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, cuando existe un incremento en la producción de ROS, la integridad de las biomoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos puede verse comprometida, por ello, la célula ha desarrollado el sistema de defensa antioxidante que comprende a moléculas no enzimáticas y a una batería de enzimas antioxidantes que poseen un rol importante en la disminución y detoxificación de las ROS (Birben et al., 2012).

La expresión y la actividad de las enzimas antioxidantes forman parte de un proceso de autodefensa de los organismos, que reducen el daño generado por el estrés ambiental (Ren et al., 2014). La CAT forma parte de este grupo de enzimas antioxidantes y juega el rol de impedir la formación de radical hidroxilo al descomponer el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno (Li et al., 2008;

Trasviña-Arenas et al., 2013). Previamente, se ha reportado que la CAT en *L. vannamei* responde a diversas de condiciones de estrés con comportamiento tejido específico en su expresión y actividad, con potencial de ser utilizada como biomarcador ante retos de variación de pH, salinidad, hipoxia-reoxigenación y cambios de temperatura en tejidos como hepatopáncreas, músculo, hemocitos y branquias (Li et al., 2008; Nogueira et al., 2017; Parrilla-Taylor; 2011; Trasviña-Arenas et al., 2013; Wang et al., 2009; Zhou et al., 2010).

La respuesta de CAT ante la hipoxia, la reoxigenación y la temperatura alta ha sido evaluada con anterioridad de manera independiente. Sin embargo, en el escenario natural los factores ambientales interactúan entre sí y pueden afectar su respuesta, por lo tanto, estas mediciones previas podrían no ser representativas del estrés en el medio ambiente y la respuesta que desencadena. Por ello, es necesario evaluar la expresión génica y la actividad de CAT en los tejidos del camarón en las condiciones de estrés más comunes durante el cultivo, como la temperatura alta, la hipoxia, la reoxigenación y sus interacciones.

2. ANTECEDENTES

2.1. Condiciones Ambientales en el Cultivo del Camarón Blanco

El cultivo de crustáceos es una actividad con alto potencial económico en todo el mundo, siendo el camarón blanco del Pacífico, *L. vannamei*, el principal producto acuícola al contribuir con 18 billones de dólares en el mercado mundial. Esta especie posee una rápida tasa de crecimiento y tolerancia a un amplio rango de salinidades, que hace posible su cultivo en alta densidad, además su requerimiento de proteína dietaria es baja en contraste a la alta producción. Sin embargo, durante el ciclo de vida de *L. vannamei*, las condiciones de crecimiento pueden variar de las óptimas y de no ser las ideales, el estado de salud, la supervivencia y el crecimiento a una talla comercial pueden verse afectados. Por ello, en el proceso de cultivo los parámetros abióticos como la temperatura, el pH, la concentración de oxígeno disuelto en agua (OD) y la salinidad, deben ser específicos y estrictamente controlados para su desarrollo óptimo (Gainza et al., 2018; Re et al., 2012; Lara-Espinoza, 2012).

La temperatura juega un rol importante en la supervivencia y desarrollo del camarón blanco. Dado que los camarones son organismos ectotermos, la temperatura posee gran influencia en su metabolismo y participa en procesos importantes como la actividad enzimática, la tasa de crecimiento y la capacidad de alimentación. Según la etapa del desarrollo en que se encuentra *L. vannamei* la temperatura óptima de crecimiento puede variar. Usualmente los camarones con un peso menor a 5 gramos se mantienen en condiciones ideales a 30 °C. En cambio, para aquellos con pesos superiores, son necesarias temperaturas de aproximadamente 27 °C. Aunque se sabe que *L. vannamei* es capaz de sobrevivir a temperaturas menores a 18 °C, esta condición térmica promueve que el organismo entre en un estado de letargo y afagia. Por el contrario, cuando el organismo se expone a temperaturas de 30 °C, se presentan comportamientos anómalos y experimentan aceleración metabólica que puede producir una pérdida de peso significativa. Por lo antes mencionado, aunque el organismo puede crecer de 27 a 31 °C, se ha establecido que una temperatura de 28 °C es la que asegura la supervivencia de esta especie de decápodos (Kumlu, 2010; Zhou et al., 2010; Lara-Espinoza, 2012).

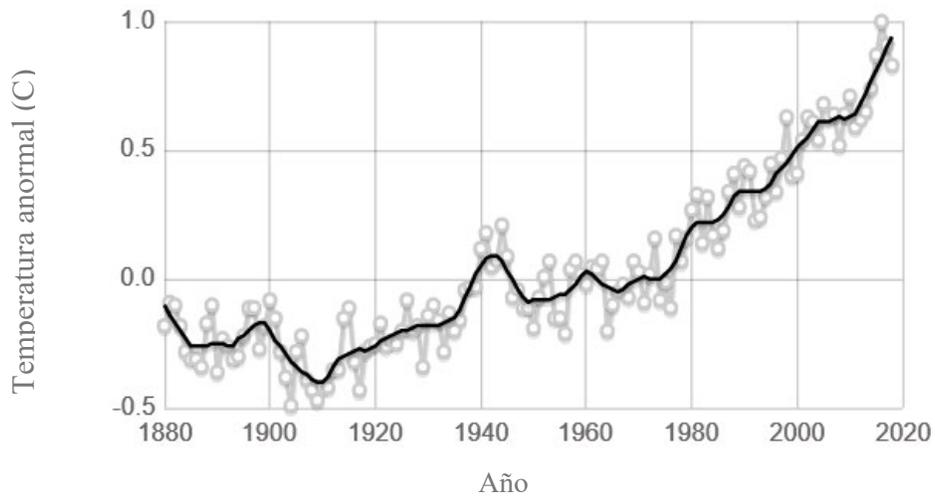
La disponibilidad de oxígeno en el agua es uno de los factores principales asociados con estados de estrés en la práctica acuícola. El oxígeno disuelto (OD) tiene origen en el intercambio gaseoso entre la atmósfera y el agua, mediante difusión, y en el proceso de fotosíntesis, realizado principalmente por especies de fitoplancton, e influye en el desarrollo del organismo (Gieskes et al., 2015). Algunas de las causas de la disminución de la concentración de OD en agua pueden ser cambios térmicos, la acumulación de detritus orgánico, la muerte de especies de fitoplancton y un aumento en la reproducción de zooplancton. Las concentraciones óptimas de OD para el desarrollo de *L. vannamei* se encuentran en el rango de 3 a 5 mg/L (Zhang et al., 2006). Otro parámetro importante que se debe considerar es la salinidad, que juega el papel de definir la organización o distribución de los organismos en el sistema de cultivo. Cuando ocurren cambios drásticos en la salinidad el crecimiento y la respuesta fisiológica de los organismos se ve afectada. Aunque las condiciones óptimas de salinidad se encuentran alrededor del 20 ‰, como organismo eurihalino, el camarón blanco puede soportar la variación de salinidad en un amplio rango de 0.5 y 50 ‰. De esta forma, salinidades de 30 ‰ son apropiadas para la reproducción, eclosión y desarrollo larvario, mientras que en la etapa de postlarva y juvenil salinidades de 15 ‰ son necesarias (Lara-Espinoza, 2012).

La actividad biológica de fitoplancton, plantas y animales productores de CO₂, el metabolismo de las bacterias anaerobias (productoras de ácidos orgánicos) y la presencia de minerales ácidos cambian el potencial de hidrógeno del agua. Por estas causas los estanques poseen un alto grado de variación de pH que puede oscilar entre 6.6 y 10.2. Los camarones en etapa juvenil son sensibles a los cambios de pH y cuando los niveles se encuentran por arriba de 9.6 o debajo de 4.5, son incapaces de sobrevivir, lo que convierte al pH en un parámetro químico de gran importancia. En los sistemas de cultivo de camarón blanco es recomendable un valor de pH ligeramente básico, esto le permitirá al organismo un mejor desarrollo, para una producción aceptable en sistemas de cultivo semi intensivos el rango de 7.4 a 8.5 es el ideal (Lara-Espinoza, 2012).

2.2. Cambio Climático, Temperatura y Disponibilidad de Oxígeno

De manera natural el clima en la tierra ha variado a lo largo del tiempo. Los ciclos estacionales anuales, el fenómeno interanual de “El niño”, el patrón de oscilación del Atlántico Norte y los periodos glaciares forman parte de esta variación. La variabilidad climática natural ha afectado la adaptación evolutiva y los patrones de distribución biogeográficas de las especies de manera paulatina. A pesar de que se trata de un proceso natural, la presión ejercida por la población humana sobre el ambiente ha alterado de manera importante la velocidad con que las variaciones climáticas se llevan a cabo. En fechas recientes, la población humana alcanzó los 7 billones de habitantes y se estima que para el año 2050 será de 8 a 10 billones, por ello la actividad antropogénica se ha añadido como un factor de gran influencia que acelera el cambio climático, debido principalmente a las emisiones de gases con efecto invernadero (Schmidtko et al., 2017).

El efecto invernadero ocurre cuando gases como el dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4) y clorofluorocarbonos (CFCs) atrapan la energía térmica en la atmósfera, que de otra manera sería irradiada de regreso al espacio. En los últimos 100 años el efecto invernadero ha provocado un incremento en el promedio de la temperatura global de $0.75\text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 1) y se estima que producirá un aumento de entre 1.5 y $5\text{ }^\circ\text{C}$ durante el próximo siglo. Este incremento en la temperatura global resultará en el cambio drástico en el clima de algunas regiones, las precipitaciones aumentarán, se elevarán los niveles de los océanos por arriba de 50 cm y ocurrirán una serie de cambios fisiológicos y químicos de los sistemas marinos, entre los que se encuentran la reducción en la concentración de oxígeno disuelto y el incremento en la tasa de consumo de oxígeno de los organismos acuáticos (Breitburg et al., 2018; Harley et al., 2006; Noone et al., 2013; Sankar et al., 2018).



Source: climate.nasa.gov

Figura 1. Cambio en la temperatura global relativa al periodo 1951-1980
 Recuperado de <https://climate.nasa.gov/vital-signs/global-temperature/>

El oxígeno juega un papel fundamental en los sistemas marinos y su disminución puede causar cambios en la productividad oceánica, la biodiversidad y los procesos bioquímicos normales. El contenido de oxígeno encontrado en las aguas oceánicas del mundo en los años sesenta era de 227.4 petamoles, sin embargo, en estudios realizados hasta el año 2017, se observó que esa concentración disminuyó en más del 2% (4.8 petamoles) con variaciones importantes de la pérdida de oxígeno en diferentes profundidades (Schmidtke et al., 2017). Esta información ilustra cómo las aguas del mundo están pasando por una etapa de desoxigenación, que en consecuencia genera una expansión de las zonas con concentraciones mínimas de oxígeno en los océanos, las cuales se han extendido en millones de kilómetros cuadrados en los últimos 50 años (Breitburg et al., 2018).

La disminución de las concentraciones de oxígeno también ha sido encontrada en áreas costeras, estas zonas conocidas como zonas muertas, han aumentado su extensión y poseen concentraciones lo suficientemente bajas para limitar la distribución y abundancia de las poblaciones animales. Con ayuda de modelos predictivos se estima que habrá una disminución del oxígeno disuelto (OD) en los océanos de hasta un 7% para el año 2100, causado por la disminución de la solubilidad del oxígeno en el agua y el aumento de la actividad de los microorganismos presentes, esto mediado por el aumento en la temperatura atmosférica y el aumento en el consumo biológico. Se cree que esta disminución en las concentraciones de oxígeno disponible puede afectar los ciclos de

nutrientes y los hábitats marinos con consecuencias potenciales para actividades económicas como la pesca y la acuicultura (Friedrich et al., 2014; Schmidtko et al., 2017).

2.3. La Hipoxia en Ecosistemas Acuáticos

La disponibilidad de oxígeno es uno de los parámetros medioambientales con mayor influencia para los organismos aerobios, ya que es un sustrato esencial en muchas de las reacciones metabólicas que sustentan la vida. En contraste con los medios terrestres, los medioambientes acuáticos suelen estar sujetos a variaciones en las concentraciones de oxígeno con mayor frecuencia y extensión espacial. En condiciones normales, gracias a la producción fotosintética y el intercambio gaseoso agua-atmosfera, los ecosistemas acuáticos poseen concentraciones de oxígeno que oscilan entre 5 y 7 mg/L. Cuando las concentraciones de oxígeno disponible disminuyen, la hipoxia se hace presente a una concentración de OD por debajo de 2 mg/L y se origina cuando la demanda biológica y algunos procesos químicos, como la oxidación de la materia orgánica, superan al proceso de oxigenación desde la atmósfera. La hipoxia es un factor importante en la aparición de estrés en los ecosistemas acuáticos (Chen et al., 2017; Fennel y Testa, 2019; Friedrich et al., 2014).

Aunque la hipoxia es una característica inherente de algunos ecosistemas, factores como la eutrofización, la estratificación de la columna de agua, el clima, algunos procesos biológicos y la actividad antropogénica promueven que su intensidad y extensión se vea exacerbada, por ello se considera como un signo común en la degradación de la calidad del agua. En años recientes, la severidad, frecuencia y duración de la hipoxia ha aumentado en todo el mundo, afectando la fisiología, el crecimiento, el desarrollo, el potencial reproductivo y la capacidad de supervivencia de los organismos acuáticos de todas las tallas, así como la distribución de la fauna y la cadena trófica. Tal presión medio ambiental ha sido evidenciada en sitios de alta actividad antropogénica como el Mar Báltico, el Golfo de México, el Mar Negro, el Mar del Este Chino y lagunas ubicadas en Suiza y Grecia (Friedrich et al., 2014; Zhang et al., 2010).

Evaluar el impacto de la hipoxia en los ecosistemas acuáticos suele ser complicado dado que existen interacciones entre múltiples estresores. En las zonas de cultivo de camarón las

concentraciones de OD se establecen entre 6 y 8 mg/L, sin embargo, cuando las condiciones cambian, la hipoxia puede inducir un estado de estrés, alterar el desarrollo óptimo, reducir la frecuencia de la muda, disminuir el crecimiento y producir la muerte (Kidwell et al., 2009; Parrilla-Taylor y Zenteno-Savín, 2011; Li et al., 2016).

2.3.1. Mecanismos de Adaptación a la Hipoxia en Crustáceos

Con frecuencia los crustáceos son afectados por ciclos recurrentes de hipoxia y reoxigenación en las zonas costeras o estuarios. Cuando estos cambios en el oxígeno disponible ocurren, se desencadenan respuestas conductuales, fisiológicas y bioquímicas de carácter adaptativo en pro de la supervivencia. Entre las estrategias conductuales usadas por algunos crustáceos ante la hipoxia se encuentra la respuesta migratoria. Se ha documentado que algunos organismos como el camarón pardo, *Penaeus aztecus*, originario del Golfo de México norte, se alejan de las zonas hipóxicas y se congregan en la periferia donde el oxígeno es suficiente para mantener su integridad. Esta habilidad se basa en un sistema de detección de oxígeno ambiental que les indica hacia dónde migrar y podría considerarse como la primera línea de defensa contra la hipoxia; también se ha estudiado este comportamiento en la gamba *Crangon crangon*, en el anfípodo *Corophium arenarium* y en camarones del género *Metapenaeus*. A pesar de esta estrategia, en ocasiones los crustáceos son incapaces de escapar y para lidiar con esta situación, es conocido que algunas especies de cangrejos pueden salir del ambiente marino para satisfacer sus necesidades de oxígeno, sin embargo, esto representa un alto riesgo de depredación (Chen et al., 2017; Gamble, 1971; Stickle et al., 1989; Wu, 2002).

La respuesta fisiológica de los crustáceos a la hipoxia incluye a la hiperventilación, un mecanismo de control de la tasa de respiración, donde la capacidad respiratoria del organismo aumenta permitiéndole extraer la mayor cantidad de oxígeno posible del agua y así transportarlo a los tejidos. Para ello, las branquias adquieren una morfología distinta que le permite aumentar la superficie disponible para el intercambio gaseoso con el medio. Simultáneamente, la concentración de hemocianina y su afinidad por el oxígeno aumenta en condiciones de OD bajas y la presión de la hemolinfa en las branquias aumenta, exacerbando el transporte de oxígeno. Los organismos con

esta capacidad son más tolerantes a las variaciones de OD y se conocen como oxirreguladores, esta habilidad puede variar dependiendo del ciclo de muda, de la cantidad de hemocianina o hemoglobina, talla, salinidad del agua y temperatura (Artigaud et al., 2014; Wu, 2002).

Para conservar la energía necesaria para sus funciones, durante los periodos de escasez de oxígeno, los crustáceos suelen deprimir su tasa metabólica. En consecuencia, hay una disminución en la síntesis de proteínas, como se ha visto en *Artemia franciscana*, que en periodos de hipoxia detiene la síntesis de proteínas mitocondriales en hasta un 77% dejando energía para sus funciones vitales; y algunas enzimas que dan paso al metabolismo anaeróbico sufren modificaciones. Organismos como *Parastacus defossus*, *Parastacus brasiliensis* y *L. vannamei* activan la vía anaeróbica de la glucólisis para mantener sus necesidades energéticas en ausencia de oxígeno. Se ha encontrado que la glucólisis anaerobia en *L. vannamei* se activa durante hipoxia moderada (1.5-2.5 mg O₂ L⁻¹) en periodos de 6 horas, 3 días o 3 semanas. Este ajuste metabólico implica la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), por lo tanto, en conjunto debe existir una respuesta antioxidante específica en condiciones de hipoxia (Trasviña-Arenas, 2012; Wu, 2002)

Después de la hipoxia; suele ocurrir el restablecimiento de las concentraciones normales de oxígeno, en un fenómeno conocido como reoxigenación, en ella el estrés oxidativo es promovido por el aumento de ROS. Algunos tejidos con alta actividad metabólica pueden ser especialmente susceptibles a las ROS generadas durante la hipoxia y reoxigenación, por ello como ventaja evolutiva se han desarrollado respuestas tejido-específicas del sistema de enzimas antioxidantes, que en cada organismo tolerante a la hipoxia pueden ser muy variables (da Silva-Castiglioni et al., 2010; Trasviña-Arenas, 2012).

2.4. Tolerancia y Respuesta a la Temperatura en Crustáceos

Debido a que la mayoría de los organismos acuáticos regulan su temperatura corporal en función de la temperatura ambiental, ésta posee gran influencia en la fisiología del crecimiento, reproducción y distribución de los organismos marinos. Temperaturas ligeramente distintas a las óptimas pueden resultar en impactos negativos, incluyendo depresión en la tasa de ventilación y actividad cardiaca, que provocan insuficiencia en el suministro de oxígeno y un aumento en la

demanda metabólica. A pesar de que los organismos ectotérmicos carecen de mecanismos termorreguladores endógenos, pueden rastrear activamente las áreas que son térmicamente favorables y evitar las que no los son, aun en entornos térmicos muy heterogéneos, con el fin de optimizar los procesos y funciones fisiológicas, minimizando el efecto de la temperatura. Por ejemplo, se ha reportado que la preferencia térmica de los organismos suele coincidir con las temperaturas óptimas requeridas para lograr el movimiento, el crecimiento y la reproducción, esto permite maximizar la energía disponible (Bertolo et al., 2011; González, 2010; Noyola et al., 2013). Las preferencias térmicas de los animales marinos suelen ser respuestas especie-específicas y son influidas por factores como la edad, el peso, la disponibilidad de alimento, la estación del año, la calidad del agua, la intensidad luminosa y la densidad biológica. Las especies marinas que habitan en zonas tropicales y subtropicales sufren mayores fluctuaciones de temperatura en periodos cortos, debido a ello, poseen rangos mayores de tolerancia para sobrevivir a los cambios rápidos de temperatura en el agua. La tolerancia térmica con frecuencia se determina al establecer la “temperatura crítica máxima” (CTMax), que se define como la temperatura a la que un organismo es incapaz de realizar movimientos coordinados de manera activa. En este punto crítico pueden ocurrir dos situaciones: que los individuos comiencen a manifestar movimientos espasmódicos incontrolables en respuesta al estrés térmico o que sean incapaces de cambiar su cuerpo de posición, si se voltean al nadar (Hopkin et al., 2006; Rebolledo y Collin, 2017).

La tolerancia térmica de los crustáceos puede manipularse por medio de la aclimatación y por choque térmico, ambos difieren en el tiempo en que se llevan a cabo y en el mecanismo responsable para el desarrollo del efecto termo-protector. El choque térmico consiste en exponer al organismo a una temperatura cercana a la letal, por un periodo muy corto de tiempo, como resultado se generan arreglos bioquímicos dentro de la célula, incluida la expresión de genes de proteínas de choque térmico. En el cangrejo *Cancer pagurus*, capturado durante el invierno y posteriormente sometido a choque térmico, se presentó un incremento en la CTMax de 1.80 °C en promedio, en cambio, al ser capturados durante el verano bajo el mismo tratamiento, aumentaron su tolerancia hasta 2.42 °C (González, 2010; Hopkin et al., 2006). Es conocido que la CTMax puede variar según las diferentes estaciones del año, por ejemplo, en las especies de cangrejo *Carcinus maenas*, *Hyas araneus* y *Necora puber*, así como en las langostas *Munida rugosa* y *Nephrops norvegicus*, se ha registrado que poseen mayor tolerancia térmica cuando son capturados en verano que en invierno, aunque entre ellos existe una tolerancia que puede variar en 10 °C. La CTMax puede ser diferente

entre organismos, debido a factores biológicos y al historial previo de exposición térmica o aclimatación del organismo. De acuerdo con lo reportado por Kumlu et al. en el 2010, el camarón *L. vannamei* tiene rangos de tolerancia térmica de 12 a 40 °C cuando se le aclimata a 30 °C por 1 h y de 10 a 35 °C cuando se le somete a 15 °C por 1 h. Este dato confirma que la aclimatación promueve la supervivencia ante la exposición a calor (Hopkin et al., 2006; Rebolledo y Collin, 2017).

2.4.1. El Estrés Térmico en Crustáceos

Diferentes mecanismos son responsables de la aparición del estrés oxidativo por el aumento de la temperatura ambiental en crustáceos. Cuando la temperatura sube, todos los procesos metabólicos son estimulados de acuerdo con los principios termodinámicos conocidos. Distintos estudios en crustáceos mencionan que el estado de estrés oxidativo por el aumento de la temperatura se debe al aumento de la permeabilidad de las membranas celulares. Este efecto produce una mayor demanda y consumo de ATP y finalmente un desajuste entre las necesidades de oxígeno y su suministro, desencadenando una deficiencia en el metabolismo aeróbico. Aunada a esta situación, se tienen evidencias de que las funciones mitocondriales se ven deterioradas durante el estrés térmico y como efecto, el oxígeno no puede ser reducido de forma completa durante la respiración. En tales condiciones, la producción de ROS aumenta aceleradamente, dando paso al estado de estrés oxidativo celular (Madeira et al., 2018; Paital y Chainy, 2014).

Los crustáceos son capaces de implementar ciertas estrategias para responder al estrés térmico, entre ellas la supresión del metabolismo aeróbico y la activación de algunas vías cito-protectoras como el incremento de las proteínas de choque térmico, de acuerdo con lo reportado en camarones como *Rhynchocinetes durbanensis* y *L. vannamei*. Para eliminar las proteínas desnaturalizadas, aumenta la proteólisis por la vía de la ubiquitina-proteasoma y para detoxificar el exceso de ROS las enzimas del sistema antioxidante se vuelven muy activas. Aunado a esto, cuando la temperatura de estrés se mantiene por periodos largos, los crustáceos pueden sufrir ataques de patógenos virales o bacterianos, provocando brotes epidemiológicos en el camarón blanco *L. vannamei* que ha

sufrido brotes epidémicos en los últimos años (Jia et al., 2014; Lushchak, 2011; Madeira et al., 2018; Tropea et al., 2015; Zhou et al., 2010).

2.5. Especies Reactivas de Oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas consideradas como subproductos inherentes del metabolismo aeróbico de los organismos, que incluyen al anión superóxido (O_2^-), radical hidroxilo ($OH\cdot$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), las cuales son moléculas altamente reactivas. En condiciones normales, entre 0.1 y 2.0% del consumo de O_2 resulta en la producción de ROS en la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, durante la producción de ATP, donde el oxígeno es reducido al adicionarse un electrón cada vez, dando lugar a la formación de superóxido (O_2^-). El superóxido producido en la cadena de transporte de electrones puede fugarse hacia la matriz mitocondrial al producirse en los complejos I y III, y hacia el espacio intermembrana al producirse en el complejo III. Subsecuentemente, el O_2^- es dismutado enzimáticamente por la superóxido dismutasa, o por reacciones no enzimáticas, a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Figura 2). El H_2O_2 producido puede tener dos destinos: reducirse completamente a H_2O o reducirse parcialmente al radical hidroxilo ($OH\cdot$) al reaccionar con metales de transición mediante las reacciones sucesivas de Haber-Weiss y de Fenton (Cuadro 1). Cuando la tasa metabólica aumenta, también aumenta la formación de las ROS (Birben et al., 2012; Li et al., 2013; Turrens, 2003).

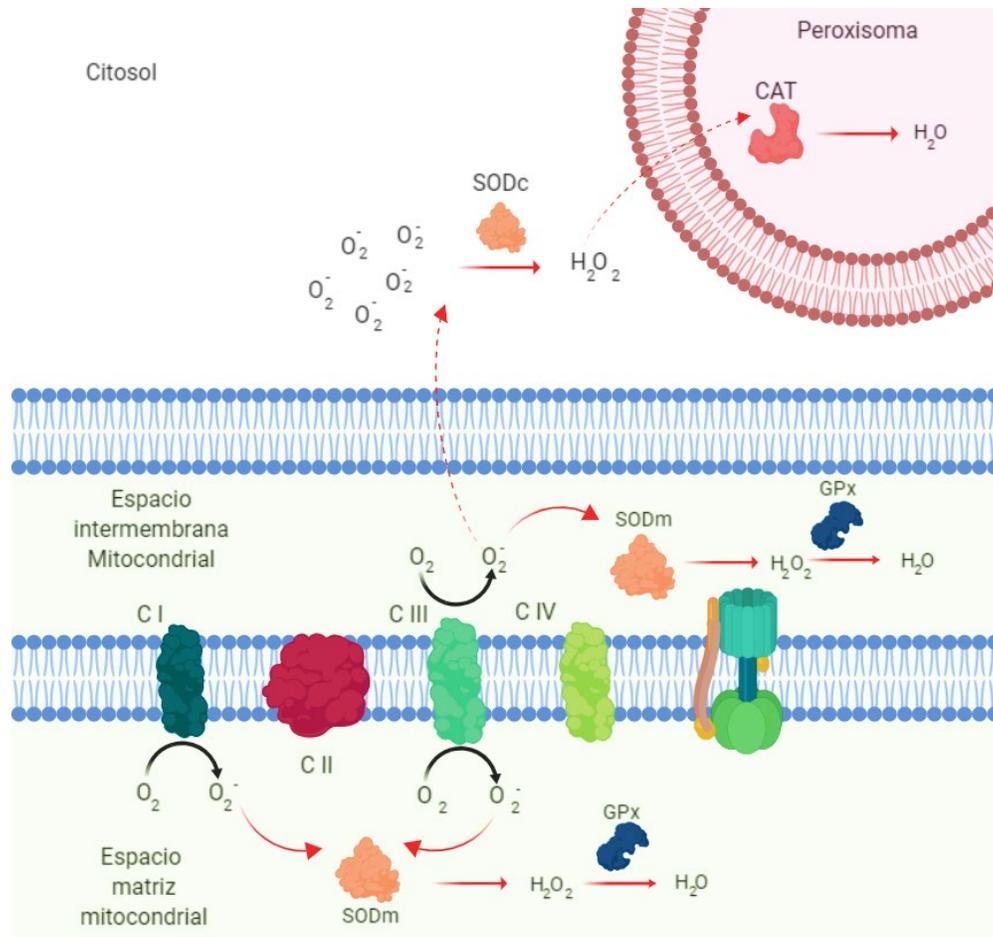


Figura 2. Producción de ROS en la mitocondria (Modificada de Li et al., 2013). Abreviaciones: Catalasa (CAT), Superóxido dismutasa citosólica (SODc), Superóxido dismutasa mitocondrial (SODm), Glutatión peroxidasa (GPx), complejo 1 (C I), complejo 2 (C II), complejo 3 (C III), complejo 4 (C IV).

Cuadro 1. Reacciones de formación del radical hidroxilo. Fuente: Birben et al., 2012

Reacción de Haber-Weiss	$Fe^{3+} + O_2^- \longrightarrow Fe^{2+} + O_2$
Reacción de Fenton	$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^-$

Las ROS tienen periodos de vida media muy cortos, por ello su influencia sobre otras moléculas es sumamente rápida. Por ejemplo, el OH^- puede sobrevivir por 10^{-10} segundos y en contraste con

el O_2^- , que se considera relativamente estable, el radical hidroxilo es considerado como el radical más reactivo en los sistemas biológicos. El H_2O_2 posee la capacidad de disolverse en soluciones acuosas y de penetrar fácilmente las membranas biológicas. Sus efectos degenerativos pueden dividirse en dos categorías: los efectos directos de sus propiedades oxidantes y los indirectos al ser precursor de OH^\cdot . El alto potencial de reactividad de los ROS y su acción tan rápida, ilustran la capacidad tóxica que pueden ejercer sobre la célula y las dificultades que existen para prevenir el daño por oxidación (Kohen, 2002; Parrilla-Taylor, 2011).

2.6. Implicaciones Biológicas del Estrés Oxidativo

En la célula existe una dinámica de equilibrio entre la producción de especies oxidantes y su neutralización, dicho equilibrio es perturbado cuando las defensas antioxidantes disminuyen frente a los oxidantes. En organismos acuáticos la alteración en tal equilibrio puede ser causada por cambios drásticos en factores ambientales como la temperatura, los niveles de oxígeno, el pH, la salinidad, a razones propias del ciclo de vida del organismo (bióticas) o a la presión ejercida por las actividades antropogénicas. Estas situaciones promueven la sobreproducción y acumulación de ROS en células y tejidos dando origen al fenómeno conocido como estrés oxidativo, donde los componentes celulares pueden verse comprometidos. Procesos como la fosforilación de proteínas, la activación de factores de transcripción, la apoptosis, la inmunidad y la diferenciación celular son dependientes de una apropiada producción de ROS y su presencia en la célula debe mantenerse en niveles bajos. Cuando los niveles de ROS aumentan los efectos negativos comienzan a manifestarse en las estructuras celulares como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Mudagandur et al., 2016; Pizzino et al., 2017; Sies, 2018).

Cuando las concentraciones de ROS se elevan, las proteínas pueden sufrir cambios en su integridad estructural al modificarse las cadenas laterales de los aminoácidos. Las ROS tienden a dirigir su ataque hacia distintos tipos de residuos aminoacídicos, por ejemplo, el H_2O_2 puede alterar a los residuos que contienen grupos sulfhidrilos como las cisteínas, que al oxidarse forman enlaces disulfuro aberrantes. Los aminoácidos básicos como arginina e histidina, que son altamente reactivos y suelen estar en el sitio activo de algunas enzimas, están sujetos a oxidación,

modificando la capacidad catalítica al alterar las cadenas laterales de los residuos. Las ROS también son responsables de modificaciones en los carbohidratos de las glicoproteínas, pérdida de metales en metaloproteínas y aumento de la susceptibilidad a proteólisis, por lo tanto, la estabilidad de las proteínas, su estructura y función pueden verse severamente afectadas por la oxidación y, en consecuencia, producir disturbios en el metabolismo celular (Parrilla-Taylor y Zenteno-Savín, 2011).

Los cambios antes mencionados en las proteínas pueden ser puntos importantes en la regulación de factores que afecten la transducción de señales y la transcripción del DNA. El DNA puede estar sujeto a distintas modificaciones por la oxidación, por ejemplo, rupturas de las cadenas dobles y sencillas, modificaciones en las bases nitrogenadas y entrecruzamientos DNA-proteína. Estas modificaciones pueden tener un carácter letal al promover la apoptosis celular. Los organismos marinos contienen altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son constituyentes de las membranas celulares, que brindan estabilidad y son altamente susceptibles a la lipoperoxidación. Estas moléculas forman radicales peroxilo y finalmente hidroperóxidos lipídicos bajo una serie de reacciones auto catalíticas en cadena, que como consecuencia acarrear modificaciones en la fluidez de la membrana celular, modificando el control de intercambio de solutos de la célula y el espacio extracelular, culminando en la ruptura de ésta (Han et al., 2018; Jena, 2012; Kohen, 2002; Parrilla-Taylor y Zenteno-Savín, 2011; Valavanidis et al., 2006).

Los efectos antes mencionados de las ROS afectan a los sistemas biológicos modificando las cascadas reguladoras, generando perturbaciones en el metabolismo celular e incluso, pueden inducir apoptosis, que, al extenderse a una parte importante de los tejidos, puede causar fallas en el funcionamiento de los órganos y la muerte del organismo. Diversos factores ambientales pueden producir estrés oxidativo en especies de camarón por la variación en la producción de ROS (Cuadro 2) (Kim et al., 2010; Lushchak, 2011; Parrilla-Taylor y Zenteno-Savín, 2011).

Cuadro 2. Producción de ROS en condiciones de estrés ambiental en camarones peneidos

Organismo	Condición	Producción de ROS	Referencia
	Exposición a 1 y 5 mg Cu/ L, 48 h	Aumento 80 veces de ROS totales en Hc	Guo et al., 2017

	pH 9.3 y 5.6 por 3 h	Aumento de aproximadamente 2.6 veces en la concentración de ROS totales en hemocitos	Wang et al., 2009
<i>L. vannamei</i>	12 °C por 3 h	Aumento en 1.8 veces de ROS totales en Hc respecto a un tiempo 0.	Qiu et al., 2011
	6 h de hipoxia h (1.5 mg/L O ₂) y 1 h reoxigenación (6 mg/L O ₂)	Disminución en la producción de O ₂ ^{·-} en 43.7 veces durante la hipoxia y aumento 2.9 veces en la reoxigenación, respecto a normoxia en hemocitos.	García-Triana et al., 2010
<i>P. monodon</i>	Infección con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> por 12 h	Aumento de 1.7 veces de O ₂ ^{·-} y 2.78 veces OH ⁻ de O ₂ ^{·-} en Hp y Br	Duan et al., 2015
	Deshidratación por periodos de 3 h	Aumento en 2 veces y 3 veces la concentración de O ₂ ^{·-} y OH ⁻ , respectivamente en Hp respecto al tiempo 0 de exposición.	Duan et al., 2016

Hc= Hemocitos, Hp= Hepatopáncreas, Br= Branquias

Para contrarrestar los efectos negativos de las ROS, las células han desarrollado una serie de mecanismos preventivos y reparadores conocido como sistema defensa antioxidante, que comprende moléculas pequeñas y enzimas especializadas (Choudhury et al., 2017).

2.7. Enzimas Antioxidantes

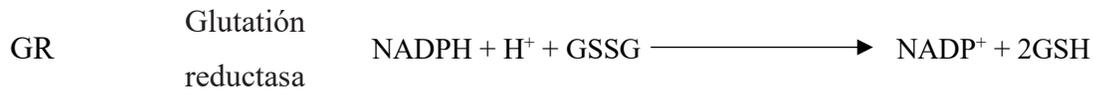
Los antioxidantes son moléculas necesarias para sostener la vida ya que estabilizan el desequilibrio electrónico ejercido por los ROS, donando o cediendo electrones y están presentes virtualmente en todos los organismos. El sistema antioxidante está compuesto por moléculas no enzimáticas y por enzimas especializadas en la detoxificación de especies reactivas. Entre los antioxidantes no enzimáticos se encuentran moléculas como vitaminas, glutatión, carotenoides, fenoles y flavonoides. Las enzimas del sistema antioxidante incluyen a superóxido dismutasa (SOD, EC

1.15.1.1), catalasa (CAT, EC 1.11.1.6), glutatión peroxidasa (GPx, EC 1.11.1.9) y glutatión reductasa (GR, EC 1.8.1.7), estas enzimas detoxifican a las peligrosas especies reactivas de oxígeno (Cuadro 3) y otros compuestos involucrados en su generación. Hay dos tipos de enzimas antioxidantes, las enzimas de fase 1, como SOD y CAT que defienden directamente de ROS como O_2^- y H_2O_2 ; y las de fase 2 como glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa, que inactivan o facilitan la excreción de los subproductos de ROS, como los producidos por la peroxidación de lípidos (An et al., 2010; Birben et al., 2012; Doyen et al., 2008; Li et al., 2016).

El O_2^- es la primera ROS en producirse y es el responsable de la formación de otros radicales más reactivos. La enzima SOD es la principal enzima detoxificante, realiza la tarea de convertir O_2^- a H_2O_2 por una reacción de dismutación y se encuentra en todos los organismos aerobios. En eucariotas, se ha clasificado en grupos de acuerdo con el metal que se encuentra asociado a su estructura en MnSOD y CuZnSOD y a otros metales como Fe. Las CuZnSOD pueden encontrarse distribuidas en el citoplasma, el núcleo y en la membrana externa de la mitocondria (SOD1) y en la membrana de la matriz extracelular (SOD3), mientras que la MnSOD de forma común se encuentra en la mitocondria, en especies de crustáceos como *L. vannamei* puede encontrarse en su forma citosólica (cMnSOD). Aunque estas enzimas catalizan la misma reacción, cada una es codificada por un gen diferente, la expresión de la SOD puede aumentar frente a diferentes fuentes de estrés como infecciones por virus (como el virus de la mancha blanca) y bacterias (como *V. parahaemolyticus*), cambios de pH, cambios de temperatura y periodos cortos de hipoxia y reoxigenación, que producen el aumento de O_2^- (García-Triana et al., 2010; Gómez-Anduro et al., 2006).

Cuadro 3. Principales enzimas antioxidantes y las reacciones que catalizan

Abreviación	Enzima	Reacción que cataliza
SOD	Superóxido dismutasa	$2O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$
CAT	Catalasa	$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$
GTPx	Glutatión peroxidasa	$H_2O_2 + 2GSH \longrightarrow 2GS + 2H_2O$
		$ROOH + 2GSH \longrightarrow 2GS + H_2O + ROH$



El H₂O₂ producido por las SOD es removido de la célula por la enzima CAT convirtiéndolo en agua y oxígeno. La CAT puede romper dos millones de moléculas de H₂O₂ por segundo, capacidad que la convierte en una enzima altamente eficiente. Normalmente la CAT se encuentra localizada en peroxisomas, citosol y ausente en mitocondrias, por lo que la GPx es la enzima encargada de descomponer el H₂O₂ en este compartimiento, usando glutación (GSH) como cofactor, además cumple la función de detoxificación de peróxidos orgánicos derivados de la oxidación lipídica. La GPx tiene isoenzimas selenio-dependientes que están distribuidas por distintos tejidos como hemocitos, hepatopáncreas, branquias, músculo e intestino. En *L. vannamei*, la expresión y la actividad de GPx se ven exacerbadas bajo infecciones y variaciones ambientales de pH, hipoxia, reoxigenación y temperatura alta. Para mantener el glutación a niveles adecuados para su uso como cofactor y como antioxidante no enzimático en la célula, la enzima GR, por medio de un mecanismo dependiente de NADPH, cataliza la reducción de glutación disulfuro a glutación reducido (Ighodaro y Akinloye 2018; Wang et al., 2012).

La evaluación de la actividad y la expresión de las enzimas del sistema antioxidante se considera como un potencial indicador del estrés oxidativo en gran cantidad de invertebrados marinos. La expresión de genes y la actividad de enzimas antioxidantes en organismos marinos ha sido evaluada en diferentes condiciones de estrés. Por ejemplo, Zhou et al. (2010) reportaron que la expresión de genes de MnSOD en hemocitos y hepatopáncreas de *L. vannamei* aumenta cuando el organismo se somete a temperaturas altas (22 y 28 °C), en comparación con organismos a 15 °C. El aumento en la actividad de enzimas antioxidantes se muestra como una ventaja evolutiva de las especies frente a las condiciones de estrés. El estrés también puede ser inducido por contaminantes en el medio donde los organismos se desarrollan. En el crustáceo *Macrobrachium borellii* expuesto a concentraciones de 0.6 mg/L de fracciones solubles de petróleo en el agua, se reportó que la actividad de algunas enzimas como SOD y CAT aumentaron en hepatopáncreas después de la exposición durante 7 días (Lavarias et al., 2011).

2.8. Características Generales de Catalasa

La catalasa es una enzima endógena y ampliamente distribuida, que forma parte del grupo de las hidroxidrogenperoxidasas, enzimas que poseen un importante papel en la detoxificación celular en condiciones de estrés. Es una hemoproteína que posee una estructura homotetramérica de 230 kDa, cada subunidad con un peso molecular entre los 50 y 60 kDa, cada monómero alberga un grupo hemo y una molécula de NADPH. El NADPH está unido a las subunidades por medio de 12 residuos de aminoácidos y juega un importante papel al evitar que la proteína se oxide con su propio sustrato. El sitio activo de la enzima de camarón blanco alberga los residuos catalíticos His71, Asn144 y Tyr354, los cuales están altamente conservados en plantas, bacterias, animales y hongos. En vertebrados, la CAT se encuentra localizada en el peroxisoma y en invertebrados como *Caenorhabditis elegans* también puede encontrarse en el citosol. La principal función antioxidante de la CAT es actuar como defensa contra los efectos negativos potenciales del H₂O₂, sustrato por el que posee alta afinidad. Su reacción general permite la degradación de H₂O₂ en agua y oxígeno de acuerdo con la siguiente reacción (Chelikani et al., 2004; Kim et al., 2010; Tavares-Sánchez et al., 2004; Welker et al., 2016):



A niveles altos de sustrato, esta es la única reacción posible para la CAT, ya que en su mecanismo de acción la oxidación del grupo hemo Fe (III) a un radical de porfirina Fe (IV), es dado por una molécula de H₂O₂, y en un segundo paso es reducido por la siguiente molécula de H₂O₂, donde la estructura vuelve a su estado nativo Fe (III). Mientras que a bajas concentraciones existe menor especificidad por el sustrato y se induce su actividad peroxidática, donde varios donadores de hidrógeno como alcoholes, fenoles, hormonas, metales pesados y nitritos sirven como moléculas en el paso de reducción (Tehrani y Moosavi-Movahedi, 2018):



La CAT aumenta su actividad o expresión en respuesta a condiciones de estrés como la hipoxia, variación de la temperatura, pH y exposición a contaminantes (Cuadro 4), este aumento es un indicativo del rol que tiene la CAT en la eliminación de H₂O₂. En reptiles, aves, mamíferos e invertebrados la CAT tiene un comportamiento tejido-específico en respuesta al estrés por hipoxia. La mayoría de los daños causados por la variabilidad en las concentraciones de oxígeno ocurren durante la reoxigenación. Por ello, existe la teoría que el aumento en la actividad de enzimas antioxidantes en una concentración de oxígeno disponible baja, se lleva a cabo anticipadamente, para proteger a la célula contra el estrés exacerbado durante el proceso de reoxigenación. Esa característica puede ser indicativo de que ciertos tejidos son susceptibles a sufrir daños por hipoxia y reoxigenación, tal como sucede en hígado de rata (Giraud-Billoud et al., 2019). La intensidad de la actividad de es muy diversa según el tipo de tejido donde se encuentre, pero su acción es muy importante para la conservación de la vida, ya que se asocia con altas concentraciones de H₂O₂ (Krivoruchko y Storey, 2013; Lushchak et al., 2001, 2006; Nakanishi et al., 1995; Yang et al., 2015).

Cuadro 4. Respuestas de catalasa a distintos tipos de estrés en camarones peneidos.

Organismo	Fuente de estrés	Tipo de respuesta	Tejido	Referencia
<i>P. monodon</i>	Infección por <i>V. parahaemolyticus</i> 12 y 24 h	Disminución AE	Hp y Br	Duan et al., 2015
<i>M. borellii</i>	Exposición a Fenitrotión 0.8 µg/L por 2 d	Aumento del 62% en AE	Hp	Lavarias et al., 2013
<i>L. vannamei</i>	Cambio de pH de 8 a 6.7 (96 y 120 h)	Disminución en la expresión >90%	Hp	Wang et al., 2012
<i>L. vannamei</i>	Choque térmico en frío (13 °C)	Aumento en AE y expresión	Hp y Hc	Xu et al., 2018
<i>L. vannamei</i>	Temperatura alta (28 °C)	Aumento de la expresión en Hc	Hp, Hc y Br	Zhou et al., 2010

<i>L. vannamei</i>	Hipoxia 24 h (1 mg O ₂ /L) y 1 h reoxigenación (6 mg O ₂ /L)	Aumento AE	Hp	Parrilla-Taylor y Zenteno-Savín, 2011
<i>L. vannamei</i>	Hipoxia (1.5 mg/L O ₂ 6 y 24 h) y reoxigenación (6 mg O ₂ /L por 1 h)	Aumento de AE Aumento de la expresión (Br)	Br y Hp	Trasviña-Arenas et al., 2013

Hc= Hemocitos, Hp= Hepatopáncreas, Br= Branquias, AE=Actividad enzimática.

En condiciones basales la expresión de CAT tiene un comportamiento tejido-específico en *L. vannamei*, según lo demostrado por Tavares-Sánchez et al. (2004) y Trasviña-Arenas et al. (2013) por PCR y RT-qPCR, respectivamente, en hepatopáncreas y branquias. Estos tejidos poseen tasas metabólicas altas, por ello pueden tener mayor expresión de CAT. El hepatopáncreas es una glándula que juega un papel muy importante en la detoxificación del organismo y las branquias se encuentran en un activo intercambio con el oxígeno, esto genera una producción constante de ROS, por ello la presencia de esta enzima es requerida, sin embargo, en músculo la expresión no ha podido ser detectada en este organismo (Tavares-Sánchez et al., 2004). El comportamiento tejido-específico en la expresión y la actividad de CAT de *L. vannamei* también ha podido ser evaluada en condiciones de temperatura alta e hipoxia y reoxigenación, en estudios separados (Parrilla-Taylor y Zenteno-Savín, 2011; Trasviña-Arenas et al., 2013; Zhou et al., 2010).

La expresión de CAT en hepatopáncreas y branquias muestra comportamientos distintos en hipoxia. En branquias la expresión de CAT aumenta cuando se somete a condiciones de hipoxia por 6 y 24 h más 1 hora de reoxigenación, comparando con condiciones de oxígeno normales (normoxia), la cual puede estar mediada por el factor de transcripción de choque térmico (HSF), que posee un rol regulador en la inducción de genes en hipoxia y reoxigenación. La actividad enzimática en branquias también aumenta en estas condiciones, en contraste, en hepatopáncreas no hay un aumento significativo en la expresión y la actividad de CAT después de hipoxia y reoxigenación. (Nishisawa et al., 1999; Trasviña-Arenas et al., 2013). Durante la exposición del organismo a 28 °C la expresión de CAT también ha tenido un comportamiento tejido específico, la expresión en hemocitos aumentó 3.2 veces en contraste a temperaturas bajas (15 °C), en branquias aumentó 2 veces y en hepatopáncreas disminuyó a la mitad (Zhou et al., 2010).

3. HIPÓTESIS

El estrés oxidativo causado por la hipoxia, la reoxigenación, la temperatura alta y sus interacciones, producen una respuesta antioxidante aumentando la concentración de H₂O₂, expresión y actividad de catalasa de manera tejido-específica en camarón blanco.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto del estrés por hipoxia-temperatura alta e hipoxia-reoxigenación temperatura alta en la concentración de H₂O₂, expresión y actividad de catalasa en branquias y hepatopáncreas de camarón blanco *L. vannamei*.

4.2. Objetivos Específicos

1. Evaluar la expresión relativa del gen de catalasa en hepatopáncreas y branquias de camarones expuestos a hipoxia, reoxigenación y temperatura alta (35 °C) por PCR en tiempo real.
2. Cuantificar la actividad enzimática de catalasa en hepatopáncreas y branquias de camarones expuestos a hipoxia, reoxigenación y temperatura alta (35 °C).
3. Cuantificar la concentración de H₂O₂ en branquias y hepatopáncreas de camarones expuestos a hipoxia, reoxigenación y temperatura alta (35 °C).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Bioensayo de Temperatura Alta, Hipoxia y Reoxigenación

Para evaluar el efecto de la temperatura alta, la hipoxia, la reoxigenación y sus interacciones sobre la actividad enzimática y la expresión del gen de catalasa y la concentración de peróxido de hidrógeno en branquias y hepatopáncreas de camarón blanco *L. vannamei* se realizó un bioensayo, coordinado por el estudiante de doctorado Ricardo González Ruiz, con 120 camarones juveniles en etapa de intermuda. Estos organismos se aclimataron por un mes en condiciones de laboratorio con agua de mar a 28 °C y con aireación constante; una vez transcurrido el periodo de aclimatación los camarones tenían un peso promedio de 24 ± 1.28 g y fueron divididos en seis grupos con 10 organismos cada uno. Cada grupo se distribuyó en un tanque de plástico con volumen disponible de 70 L, colocando 50 L de agua de mar. Los tratamientos fueron: a) Control en normoxia (6 mg OD/L) a 28 °C, b) normoxia a 35 °C, c) hipoxia (1.5 mg OD/L) a 28 °C, d) hipoxia a 35 °C, e) hipoxia a 28 °C seguido de 1 hora de reoxigenación y f) hipoxia a 35 °C seguido por 1 hora de reoxigenación. Las concentraciones de OD en el agua durante los tratamientos se monitorearon utilizando un oxímetro y se mantuvieron suministrando nitrógeno gaseoso por burbujeo, para disminuir la concentración de O₂, o aireación para aumentarla, según el caso. Para el control y mantenimiento de la temperatura se utilizaron calentadores de acuario, que permitieron alcanzar las condiciones deseadas en el transcurso de 1 hora. Finalmente se diseccionaron n=3 muestras de branquias y hepatopáncreas de cada uno de los tratamientos e inmediatamente se congelaron con nitrógeno líquido con y sin Reactivo TRI (Sigma) y se almacenaron a -80 °C para su análisis posterior.

5.2. Evaluación de la Expresión Relativa de Catalasa por PCR en Tiempo Real

5.2.1. Extracción de RNA total y Síntesis de cDNA

Para analizar la expresión del gen de catalasa se extrajo RNA total a partir de hepatopáncreas y branquias utilizando TRI-Reagent (Sigma-Aldrich). Para homogeneizar el hepatopáncreas se utilizó el homogeneizador manual Kontes, mientras que las branquias se homogeneizaron por sonicación en 750 μ L TRI por cada 75 mg de tejido. Este homogeneizado se incubó por 5 min y se añadió 75 μ L de 1-bromo-3-cloropopano, se agitó vigorosamente por 15 s y se centrifugó a 12000 xg por 15 min a 4 °C. Evitando tomar la interfase cuyo contenido es rico en DNA, se tomó la fase acuosa que contenía el RNA, a la cual se le adicionaron 375 μ L de 2-propanol, se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 xg por 10 min a 4 °C. La fase acuosa fue descartada y se lavó el pellet de RNA añadiendo 750 μ L de etanol al 75%, posteriormente se centrifugó a 7500 xg por 5 min a 4 °C, se permitió su secado a temperatura ambiente y se resuspendió con 30 μ L de agua libre de nucleasas. La concentración de RNA total se cuantificó por la absorbancia a 260 nm y la pureza se determinó mediante la relación A260nm/A280nm en un espectrofotómetro NanoDrop ND-2000c. Una vez realizada la cuantificación se evaluó la integridad de los RNAs mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para la eliminación del DNA genómico remanente del RNA total se utilizó DNasa I (Roche). Por cada 10 μ g de RNA se usaron 8 unidades de DNasa para digerir por 30 min a una temperatura de 37 °C, para detener la digestión se agregó 1 μ L de EDTA 0.2 M y se calentó a 75 °C por 10 min. Se realizó la síntesis de cDNA por duplicado usando la reacción de transcripción inversa (RT) con el kit Quantitect Reverse Transcription (Qiagen) para cada una de las muestras de hepatopáncreas y branquias de acuerdo con las recomendaciones del proveedor en un volumen final de 10 μ L, donde se utilizaron 500 ng de RNA total tratado con DNasa con 0.5 μ L de Quantiscript RT Buffer 5x y 0.5 μ L de RT primer Mix; la reacción se incubó por 30 min a 42 °C en un baño de agua y finalmente se detuvo a 95 °C por 3 min. Finalmente se agregaron 10 μ L de agua libre de nucleasas para obtener una solución con concentración final de 25 ng/ μ L del RNA total original.

5.2.2. Cuantificación de Transcritos por RT-qPCR

Las muestras de cDNA (equivalentes a 25 ng de RNA total) se utilizaron para cuantificar los niveles de transcrito de CAT por RT-qPCR usando los oligonucleótidos específicos FwCatRT y CatCBRTRv3 para CAT, que amplifican un producto de 219 pb y como normalizador se utilizó el gen de la proteína ribosomal L8 usando los oligonucleótidos L8F2 y L8R2 que amplifican un producto de 166 pb (Cuadro 4). Para ambos genes se realizaron curvas de calibración con diluciones seriadas de cDNA de 5×10^{-3} a 5×10^{-7} ng/ μ L (del RNA total original). Las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes finales de 15 μ L con 7.5 μ L de 2X SYBR Green qPCR Master Mix (Bimake), 1 μ L de cDNA (derivado de 25 ng de RNA total) como templado y una concentración de oligonucleótidos de 350 nM y 750 nM para CAT y L8, respectivamente. Las condiciones de amplificación y detección de los amplicones fueron: 95° C por 5 min (1 ciclo); 95° C por 30 s, 60° C por 35 s y 72° C por 55 s (40 ciclos), con una única medición de fluorescencia en la extensión en un termociclador Real-Time CFX96-touch PCR (Bio-Rad). Se incluyeron reacciones sin templado como controles negativos y duplicados de cada cDNA (Trasviña-Arenas et al., 2013). Para validar la especificidad de las reacciones, se generó una curva de fusión al terminar el qPCR, aplicando un gradiente de temperatura de 65 a 95 °C, donde se obtuvo un pico único correspondiente a cada amplicón. La expresión relativa, corregida por eficiencias diferentes al 100%, se calculó mediante la ecuación de Pfaffl (1):

$$Expresion\ relativa = \frac{(E_{CAT})^{\Delta Ct^{(CAT)}(Control-muestra)}}{(E_{L8})^{\Delta Ct^{(L8)}(Control-muestra)}} \quad (1)$$

Donde E_{CAT} y E_{L8} representan las eficiencias de amplificación de CAT y L8, respectivamente. La eficiencia aplicada en la ecuación de Pfaffl se calculó al dividir el porcentaje de eficiencia de la reacción entre 100 más 1. $\Delta Ct^{(CAT)}$ y $\Delta Ct^{(L8)}$ es la diferencia entre la media del Ct del tratamiento control menos el Ct de la muestra para el gen de CAT y L8, respectivamente. El Ct es el número

de ciclos necesarios para que la fluorescencia generada por el aumento del amplicón se alce por arriba de la fluorescencia del fondo (Pfaffl, 2001).

Cuadro 5. Oligonucleótidos específicos usados en RT-qPCR

Gen	Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Posición en cDNA	Producto (pb)	Numero de acceso
CAT	FwCatRT	GTGAAGTTTTACACAGAAGAAGG	460-482	219	AY518322.1
	CatCBRTRv3	AGGGGTTTCCTCTGTCAGAG	678-660		
L8	L8F2	TAGGCAATGTCATCCCCATT	334-353	166	DQ316258.1
	L8R2	TCCTGAAGGGAGCTTTACACG	480-500		

5.3. Ensayo de Actividad de Catalasa

5.3.1. Fraccionamiento Celular de Tejidos de Branquias y Hepatopáncreas

Para cuantificar la actividad de CAT en las muestras de branquias y hepatopáncreas de *L. vannamei* expuestos a temperatura alta, hipoxia y reoxigenación, se realizó el fraccionamiento celular con el objetivo de obtener la fracción citosólica (Fc) según el protocolo modificado de Reyes-Ramos et al. (2018). Para ello se tomaron muestras individuales de branquias con pesos de 200-500 mg y de hepatopáncreas de 200-400 mg. Las branquias y hepatopáncreas se homogeneizaron usando el Buffer A (sacarosa 250 mM, Tris-HCl 15 mM pH 7.5, EDTA 15 mM, PMSF 1 mM) con una proporción 1:2 y 1:1 p/v, respectivamente. Para homogeneizar las branquias se utilizó un sonicador ultrasónico Branson modelo 250 con punta delgada con 5 ciclos de 10 s de pulsación con pausas entre pulsos de 10 s cada uno (40 % de la duración de cada pulso por segundo). Para las muestras de hepatopáncreas se utilizó el homogeneizador manual Kontes. En ambos casos se mantuvo la muestra en hielo en todo momento. Una vez homogeneizadas las muestras, se tomó el equivalente

a 100 mg de cada una y se diluyó con Buffer A para llegar a una proporción 1:10 p/v, para obtener las fracciones citosólicas, el homogenado fue sometido a centrifugación diferencial (1000 xg a 4 °C por 30 min, 1200 xg a 4°C por 10 min, 20000 a 4°C por 20 min), al final de la tercera centrifugación se tomó la Fc correspondiente al sobrenadante para realizar la cuantificación de actividad y proteína total. El pellet o fracción mitocondrial se utilizó para la evaluación de otros marcadores de estrés en otros estudios. Ambas fracciones se almacenaron a -80 °C.

5.3.2. Cuantificación de la actividad específica de catalasa

La actividad de CAT se determinó en microplaca de acuerdo con el protocolo descrito por Johansson y Borg (1988) con algunas modificaciones. Esta técnica aprovecha la capacidad peroxidática de la CAT al usar metanol como donador de electrones a bajas concentraciones de H₂O₂ con la producción de formaldehído, el cual reacciona con el cromógeno Purpald (4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,-triazol) y puede ser cuantificado espectrofotométricamente. Para cuantificar la actividad de CAT se realizaron diluciones de la fracción citosólica de cada tejido de 1:2 y 1:20 para branquias y hepatopáncreas, respectivamente. Se utilizaron 20 µL de la fracción citosólica diluida y 150 µL de mezcla de reacción (100 µL de buffer 100 mM KH₂PO₄, pH 7.0 + 30 µL de metanol 5.9 M y 20 µL de H₂O₂ 4.2 mM), se dejó reaccionar por 20 min en un columpio de agitación y posteriormente se detuvo la reacción con 30 µL de KOH 10 M. A continuación, se agregaron 30 µL de Purpald 32.4 mM, se incubó por 10 min a temperatura ambiente, finalmente, para la oxidación del cromógeno ligado al formaldehído se añadieron 10 µL de peryodato de potasio (IKO₄ 65.2 mM/KOH 0.5 M) y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. El cambio de color se midió mediante la absorbancia a 550 nm en un lector de microplacas Bio-Rad Modelo 680. Como control positivo se utilizaron 1,500 U/mg de CAT de hígado bovino (Sigma). Para calcular la actividad de CAT, se construyó una curva estándar de formaldehído con concentraciones de 0 a 45 µM de H₂O₂ y con base a la ecuación generada por la regresión lineal de la curva estándar se cuantificó la concentración de formaldehído producido en µM (Ecuación 2), donde 0.17 mL corresponde a al volumen total de reacción y 0.02 mL representa el volumen de la muestra o estándar.

$$\text{Concentración } \mu\text{M de formaldehído} = \left[\frac{\text{Absorbancia de la muestra} - \text{intercepto en } y}{\text{pendiente}} \right] \times \left[\frac{0.17 \text{ mL}}{0.02 \text{ mL}} \right] \quad (2)$$

$$\text{Actividad de CAT} \left(\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right) = \left[\frac{\mu\text{M de formaldehído}}{20 \text{ min}} \right] \times \text{dilucion de la muestra} \quad (3)$$

Para normalizar la actividad de CAT, se cuantificó la concentración de proteína en las fracciones citosólicas por el método de Bradford (1976) y se expresó como actividad específica en U/mg de proteína.

5.4. Cuantificación del H₂O₂ por el método de rojo de fenol-peroxidasa

La concentración de H₂O₂ se determinó con la metodología reportada por Messner & Bold (1994) con algunas modificaciones. Para hepatopáncreas se homogeneizaron 25 mg de tejido en 200 μL de Buffer Tris-HCl 0.1M, β Mercaptoetanol 5mM, pH 8, seguido de la adición de 320 μL de SDS al 10%. En el caso de branquias se utilizaron 50 mg de tejido y 100 μL del buffer antes mencionado, homogeneizando en un sonicador ultrasónico con punta delgada con 2 ciclos de 5 s de pulsación con pausas entre pulsos de 5 s cada uno (40 % de la duración de cada pulso por segundo), posteriormente se agregaron 160 μL de SDS al 10%. A continuación, se centrifugó a 12000 xg por 20 min a 4° C y se separó el sobrenadante (extracto acuoso). Para cuantificar la concentración de H₂O₂ en el extracto acuoso se realizaron diluciones de cada tejido de 1:2 y 1:15 para hepatopáncreas y branquias, respectivamente. En una microplaca de 96 pozos se agregaron a 6 μL de muestra, 194 μL de la mezcla de rojo de fenol (MES 10 mM, rojo de fenol 40 μM y peroxidasa de rábano 0.01 mg/ml, pH 6.5), se mezcló e incubó 15 min a temperatura ambiente y se detuvo la reacción al agregar 10 μL de NaOH 1 N. La absorbancia se midió a 595 nm en un lector de microplaca Multiscan Sky (Thermo Scientific). Para determinar las concentraciones de H₂O₂ presente en las

muestras se realizó una curva estándar de 0 a 40 μM de H_2O_2 y los resultados fueron normalizados y expresados en nmoles de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{g}$ de tejido (García-Triana et al., 2010; Pick & Keisari, 1980).

5.5. Análisis Estadístico

Para evaluar las interacciones de los factores se realizó un diseño completo al azar con arreglo factorial 2x3, donde el factor temperatura (A) contaba con dos niveles (28° y 35 °C) y la concentración de oxígeno (B) con tres niveles (normoxia, hipoxia y reoxigenación). La normalidad de los datos se confirmó por medio de la prueba de Kolmogórov-Smirnov. Las diferencias en la producción de peróxido de hidrógeno, expresión y actividad de CAT entre tratamientos se analizaron por un ANOVA factorial y una comparación de medias de Tukey-Kramer. Los grupos se consideraron estadísticamente diferentes a una $p < 0.05$. El análisis se realizó en el software NCSS 2007.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Expresión Relativa de Catalasa en Branquias y Hepatopáncreas

La expresión relativa de catalasa respecto a la proteína ribosomal L8 fue evaluada en branquias y hepatopáncreas de camarones expuestos a hipoxia, reoxigenación y temperatura alta mediante RT-qPCR, considerándose una $R^2 > 0.95$ como válida. La eficiencia de amplificación de CAT fue de 92.4-96.2% y de 81-90.9% para L8 al evaluar la expresión en branquias, mientras que la eficiencia fue de 92.4-106.6% y 95.7-117.8% para CAT y L8, respectivamente, al evaluar la expresión en hepatopáncreas; por lo que se aplicó la ecuación de Pfaffl para hacer el ajuste por eficiencias diferentes al 100%. El efecto de los tratamientos en la expresión de CAT relativa a L8 en branquias y hepatopáncreas se muestra en la Figura 3. En branquias, los tratamientos de reoxigenación y su interacción con la temperatura alta afectaron los niveles de transcrito de CAT de camarones expuestos. La expresión de CAT aumentó significativamente por efecto de la reoxigenación a 28 y 35 °C (R28 y R35) con respecto a normoxia a 28 °C (N28), de 12.14 y 5.46 veces, respectivamente. En el tratamiento R35 la expresión relativa de CAT fue 6.67 veces menor que en R28.

Según lo reportado por Zhou y colaboradores (2010), en las branquias de *L. vannamei* en condiciones de normoxia se tuvo un aumento significativo en la expresión relativa de CAT a temperaturas de 22 y 28 °C con respecto a la temperatura control de 15 °C; mientras que en el presente trabajo no se detectó el efecto a de la temperatura alta (35 °C), pero sí se detectó el efecto de la interacción de reoxigenación y la temperatura alta al aumentar 5.46 veces con respecto al control N28 y presentó un efecto negativo en la expresión de CAT con respecto a R28, debido a la interacción de los factores reoxigenación-temperatura alta. Por su parte, Trasviña-Arenas y colaboradores (2013) probaron el efecto de la hipoxia y la reoxigenación en periodos de 6 y 24 h encontrando un aumento de 3.77 y 3.23 veces la expresión relativa de CAT en branquias en los tratamientos de 1 h de reoxigenación después de 6 y 24 h de hipoxia, respectivamente, una tendencia similar en la expresión durante hipoxia y reoxigenación fue observada en este estudio.

En hepatopáncreas, los tratamientos de temperatura alta, hipoxia y reoxigenación no ejercieron efectos significativos en la expresión de CAT. En el tratamiento de hipoxia por 24 h a 28 °C (H28) se tuvo una disminución en la expresión de CAT respecto a la normoxia, sin embargo, estos cambios no son estadísticamente significativos; de igual manera a 35 °C la expresión de CAT en normoxia y reoxigenación mostró niveles más altos que a 28 °C, siendo de 2.5 veces más alto en la normoxia a 35 °C (N35) y 14.3 veces en R35, respecto a N28. Zhou y colaboradores (2010) evaluaron el efecto de la temperatura en hepatopáncreas de *L. vannamei* en condiciones de normoxia, donde reportan una disminución significativa en la expresión relativa de CAT a temperaturas de 22 y 28 °C con respecto a un control a 15 °C. En contraste, en el presente trabajo, la tendencia que se detectó fue un aumento en la expresión de CAT al aumentar la temperatura, en un rango de temperatura más alto (35°C).

De acuerdo con el estudio de Trasviña-Arenas y colaboradores (2013), durante la hipoxia y la reoxigenación en periodos de 6 y 24 h a 28 °C tampoco se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de CAT en hepatopáncreas con respecto a normoxia; sin embargo, la tendencia encontrada en el presente estudio en los tratamientos a 28 °C 24 h de hipoxia (H28) y (R28) es similar a lo reportado para 6 h de hipoxia y 6 h de hipoxia más 1 h de reoxigenación, esto podría deberse a variabilidad biológica natural entre poblaciones de organismos.

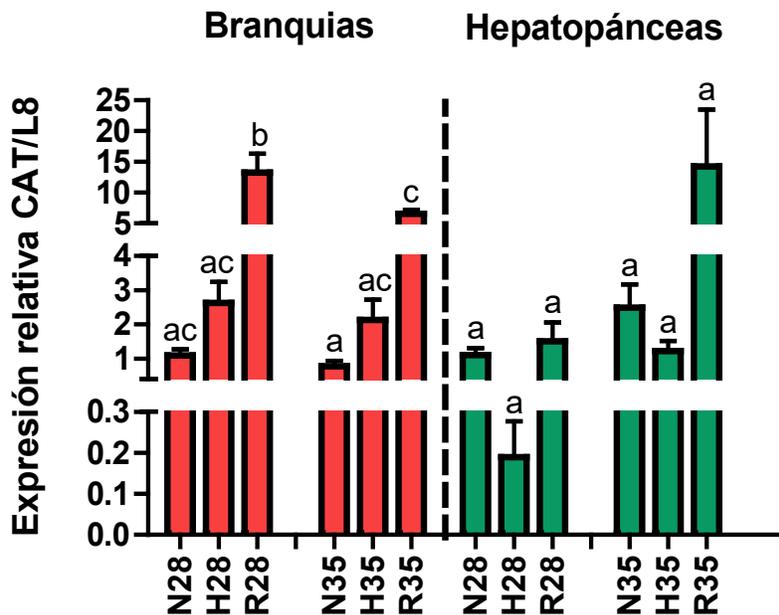


Figura 3. Expresión relativa de catalasa en branquias y hepatopáncreas. Los tratamientos se abrevian de la siguiente manera: N28 (Normoxia por 24 h a 28 °C), H28 (Hipoxia por 24 h a 28 °C), R28 (Hipoxia por 24 h más 1 h de reoxigenación a 28 °C), N35 (Normoxia por 24 h a 35 °C), R35 (Hipoxia por 24 h a 35 °C), R35 (Hipoxia por 24 h más 1 h de reoxigenación a 35 °C). Distintas literales denotan diferencias estadísticamente significativas (ANOVA $p < 0.05$). Las barras muestran las medias \pm DE.

6.2. Actividad de Catalasa en Branquias y Hepatopáncreas y su Relación con la Concentración de H_2O_2

La actividad de CAT se cuantificó en fracciones citosólicas de cada tejido y pudieron identificarse patrones de respuesta tejido-específicos en hepatopáncreas y branquias, siendo hepatopáncreas el tejido con mayor actividad (Figura 4). En branquias, la actividad de CAT no fue afectada por los tratamientos ($p > 0.05$), sin embargo, dos tendencias fueron identificables. En el tratamiento de 24 h de hipoxia a 28 °C (H28) hubo un aumento en la actividad enzimática y una disminución a las 24 h de hipoxia más 1 h de reoxigenación a 28 °C (R28). Trasviña-Arenas y colaboradores reportaron en 2013 que en branquias de camarones expuestos 24 h de hipoxia a 28 °C se tuvo esta misma tendencia de aumento en la actividad de CAT en hipoxia y disminución en la reoxigenación,

respecto a la normoxia, en su caso, el efecto fue estadísticamente significativo. En cuanto a lo obtenido en los tratamientos con temperatura alta, en H35, una ligera disminución de la actividad enzimática fue detectada seguido de un restablecimiento en la actividad durante el periodo de reoxigenación (R35). A primera vista, estos resultados de la actividad de CAT en branquias podrían parecer incongruentes con lo reportado por Trasvina-Arenas y colaboradores (2013) para la expresión en el mismo tejido, la cual en el presente trabajo si fue afectada por la reoxigenación y por la interacción con el estresor térmico (35 °C), no obstante, los procesos de transcripción y traducción no son simultáneos, por lo que los efectos a nivel de proteína podrían ser observables posterior a la expresión. Es importante remarcar que, debido a los distintos puntos de regulación de la expresión génica, los niveles de RNAm no siempre coinciden con los de proteína activa.

De acuerdo con estudios realizados por Paulding y col. (2002) y Clerch y Massaro (1992), la transcripción de CAT puede ser afectada por condiciones como la hipoxia e hiperoxia, ya que estas situaciones alteran la estabilidad del mRNA. Además, se ha documentado en organismos como la tortuga galápagos de florida (*Trachemys scripta elegans*) que los cambios en la expresión y actividad de CAT podrían asociarse a la activación de factores de transcripción de la familia de FoxO, los cuales son sensibles a los cambios del estado Redox en la célula. Asimismo, la elevación en la temperatura se ha asociado como un factor ambiental que promueve la expresión de CAT en organismos como el pólipo de agua *Hydra vulgaris* expuesto a 30 °C por 1 h. En la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) sometida a temperaturas de 37 °C, Wieser y col. (1991) encontraron una relación entre la presencia del factor de transcripción (HSF) y el aumento en los niveles del transcrito de CAT. El factor de transcripción de choque térmico (HSF) es producido gracias a la desnaturalización de las proteínas del choque térmico (HSP) por exposición a temperaturas altas. Una vez que las HSF se forman pueden ser traslocadas al núcleo y producir la inducción de genes encargados de la respuesta ante el estrés. Aunque actualmente no existen evidencias sobre la regulación entre el HSF y la expresión de CAT, el gen de CAT de camarón blanco contiene un elemento de reconocimiento para HSF el cual podría estar involucrado en su inducción durante la exposición a temperaturas altas (Dash y Phillips, 2012; Hermes-Lima et al., 2015; Trasviña-Arenas et al., 2013).

Por otro lado, Currie y Tanguay en 1991, tras exponer a ratas albinas a choque térmico de 42 °C por 15 min encontraron un aumento en la actividad de CAT en después de 24 y 48 h en corazón, donde se concluyó que este aumento en la actividad no se atribuía a la regulación transcripcional,

si no a mecanismos de regulación postraduccionales. En células de ratón, la principal modificación postraducciona de CAT es la fosforilación mediada por las cinasas c-Abl y Arg, las cuales son proteínas que en presencia de concentraciones bajas de H_2O_2 se dimerizan y se asocian a CAT, fosforilándola y aumentando su actividad. Si las concentraciones de H_2O_2 aumentan a un nivel que suponga un riesgo para la célula, el dímero se disocia de CAT haciéndola susceptible a ubiquitinación y a su posterior degradación (Cao y Kufe, 2003; Rhee et al., 2005).

En el hepatopáncreas la actividad no mostró diferencias significativas a 28 °C por efecto de la hipoxia y 24 h de hipoxia más 1 h de reoxigenación. Estos resultados son comparables con el estudio de Trasviña-Arenas y colaboradores (2013), quienes reportaron que la actividad de CAT no se ve influenciada significativamente por periodos de hipoxia por 24 h o por 24 h de hipoxia más 1 h de reoxigenación a 28 °C. Asimismo, este comportamiento fue observado por Parrilla-Taylor y Zenteno-Savín (2011) en condiciones similares de hipoxia y reoxigenación para CAT y glutatión peroxidasa en *L. vannamei*. En el presente estudio, la temperatura alta (35°C) aumentó significativamente la actividad enzimática de CAT en los tratamientos de normoxia, 24 h de hipoxia y 24 h de hipoxia más 1 h de reoxigenación, en 2.06, 1.14 y 2.20 veces, respecto a normoxia a 28 °C. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Becker y colaboradores (2011) en la pulga de agua *Daphnia magna*, donde el cambio en la temperatura de 20 a 30 °C indujo aumentos en la actividad de CAT, acompañadas de patrones similares en la producción de especies reactivas de oxígeno. En investigaciones similares se ha evidenciado que la concentración de ROS está íntimamente relacionada con la actividad de CAT en animales marinos expuestos a diferentes condiciones de estrés.

De acuerdo con Wang y colaboradores (2012) en el cefalotórax de camarones peneidos retados con inyecciones de H_2O_2 en dos concentraciones, 0.01% (baja) y 0.1% (alta), hubo un aumento en la actividad de CAT al administrar ambas concentraciones, mientras que la expresión aumentaba solamente al administrar la concentración más alta. En otro estudio, en el hígado del pez *Megalobrama ambycephala*, la disminución del oxígeno disponible (1.0 mg/L de OD por 6 h) promovió la disminución en la producción de H_2O_2 acompañado de una baja en la actividad de CAT, mientras que durante la reoxigenación la producción de H_2O_2 aumentó acompañada del mismo patrón en la actividad de la enzima (Chen et al., 2017).

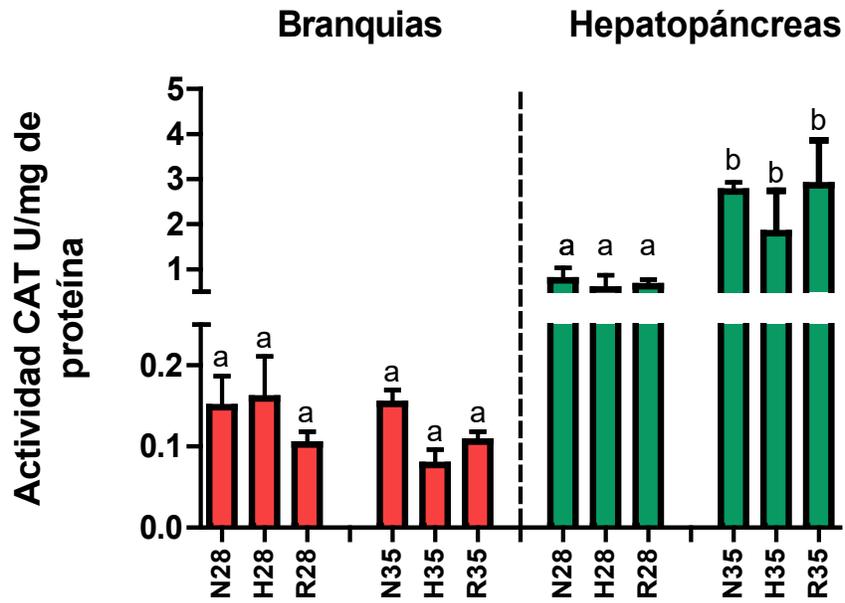


Figura 4. Actividad de catalasa en branquias y hepatopáncreas. Los tratamientos se abrevian de la siguiente manera: N28 (Normoxia por 24 h a 28 °C), H28 (Hipoxia por 24 h a 28 °C), R28 (Hipoxia por 24 h más 1 h de reoxigenación a 28 °C), N35 (Normoxia por 24 h a 35 °C), R35 (Hipoxia por 24 h a 35 °C), R35 (Hipoxia por 24 h más 1 h de reoxigenación a 35 °C). Distintas literales denotan diferencias estadísticamente significativas (ANOVA $p < 0.05$). Las barras muestran las medias \pm DE.

La concentración de H_2O_2 en hepatopáncreas se determinó utilizando extractos acuosos partiendo de tejido congelado a $-80\text{ }^\circ\text{C}$, los resultados se muestran en la Figura 5. Donde, los tratamientos de temperatura alta, hipoxia, reoxigenación, ni sus interacciones afectaron significativamente a la concentración de H_2O_2 , las medias fueron de 12.7, 10.5 y 10.5 nmoles/g de tejido para normoxia, hipoxia y reoxigenación, respectivamente. Estas concentraciones se encuentran en el mismo orden de magnitud que los resultados reportados por García-Triana y colaboradores (2016) en hepatopáncreas de camarones en condiciones de normoxia a $28\text{ }^\circ\text{C}$, no obstante, estos autores sí encontraron aumentos significativos por efecto de la hipoxia (6 y 24 h) y por las reoxigenaciones (6 y 24 h más 1 h de reoxigenación). En estos términos, el comportamiento identificado en hepatopáncreas de *L. vannamei* es interesante, ya que se hipotetizaba que el aumento en la actividad durante el estrés térmico podría atribuirse a un aumento paralelo en la tasa metabólica y en la producción de ROS, sin embargo, este comportamiento no fue detectado en la producción de H_2O_2 ,

ya que las concentraciones no se vieron afectadas por la hipoxia, la reoxigenación o la temperatura alta (Becker et al., 2011).

La actividad de CAT habitualmente se ha vinculado con altas concentraciones de sustrato, esto en virtud de que su afinidad por el H_2O_2 es menor respecto a otras peroxidadas. Esto podría sugerir que, aunque en el hepatopáncreas de *L. vannamei* durante exposición a hipoxia, reoxigenación y temperatura alta no hay alteraciones estadísticamente significativas en el contenido de H_2O_2 , la respuesta reflejo en la actividad de CAT muestran un posible incremento biológico de H_2O_2 que es contenido por la capacidad de alostasis de la célula frente al cambio ambiental, evitando el daño a los componentes celulares. Un ejemplo de este comportamiento es el reportado en el camarón kuruma, *Marsupenaeus japonicus*, por Zheng y colaboradores (2019) donde al exponer a los organismos a temperaturas de 32 °C, por periodos de 24, 48, 72 y 96 h, y a 34 °C por 3, 6 y 12 h, el aumento en la actividad de CAT fue identificado, sin embargo en esos tiempos de exposición, no hubo cambios en el contenido de marcadores de daño oxidativo como el malondialdehído, por lo que la protección de las enzimas del sistema antioxidante fue efectiva en evitar la oxidación de los lípidos presentes en el hepatopáncreas. Es importante considerar que el aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes *per se* podría no ser reflejo de daño oxidativo por aumento en la producción de ROS, más bien debería considerarse como resultado de la capacidad antioxidante del organismo frente al reto, sobre todo cuando hay factores ambientales combinados.

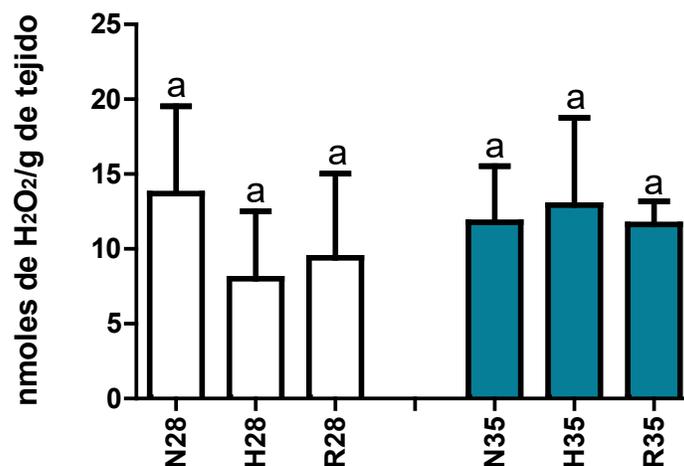


Figura 5. Concentración de H_2O_2 en hepatopáncreas. Los tratamientos se abrevian de la siguiente manera: N28 (Normoxia por 24 h a 28 °C), H28 (Hipoxia por 24 h a 28 °C), R28 (Hipoxia por 24

h más 1 h de reoxigenación a 28 °C), N35 (Normoxia por 24 h a 35 °C), R35 (Hipoxia por 24 h a 35 °C), R35 (Hipoxia por 24 h más 1 h de reoxigenación a 35 °C). ANOVA $p > 0.05$. Las barras muestran las medias \pm DE.

En branquias, distintas estrategias fueron empleadas para cuantificar el H_2O_2 , entre ellas usar fracciones citosólicas (Fc) congeladas y recién obtenidas, donde la señal no fue detectada; así mismo se probaron extractos crudos no centrifugados (EC) en Buffer A, extractos acuosos a partir de EC centrifugados y extractos crudos y acuosos a partir de tejido congelado, homogeneizado por sonicación de 5 ciclos de 10 s de pulsación con pausas entre pulsos de 5 s (40 % de la duración de cada pulso por segundo), donde la señal era detectable; sin embargo, ocurrieron fallas en el congelador donde se encontraba almacenado el stock de muestras de tejido, provocando la descongelación parcial de las muestras, lo cual pudo provocar la pérdida de H_2O_2 haciéndolo indetectable. Debido a esto, se probó usar 4 veces más tejido, homogeneizando en condiciones menos fuertes con sonicación de 2 ciclos de 5 segundos de pulsación con pausas entre pulsos de 5 s cada uno (40 % de la duración de cada pulso por segundo), sin embargo, tampoco fue posible detectar H_2O_2 .

Aunado a que la técnica no es sensible a concentraciones menores a 1 nmol/g de tejido, la manipulación del tejido, que incluye los ciclos de congelación y descongelación, la homogenización por sonicación y la centrifugación utilizada para obtener fracciones celulares y extractos acuosos, podrían contribuir en la pérdida del H_2O_2 al tratarse de una molécula químicamente inestable. Cabe mencionar que, en otro estudio, las concentraciones de H_2O_2 en camarones en condiciones de normoxia a 28 °C en branquias fueron 3 veces más bajas que en hepatopáncreas, usando el mismo método de cuantificación (García-Triana et al, 2010). En el presente estudio la actividad de CAT mostró la tendencia de aumentar en H28 y disminuir durante la R28, la concentración de H_2O_2 en branquias no pudo ser detectada en ninguno de los tratamientos. De acuerdo con los resultados reportados por García-Triana y colaboradores en 2016 la concentración de H_2O_2 en branquias no era afectada por la hipoxia de 6 y 24 h, ni por periodos de hipoxia de 6 y 24 más 1 h de reoxigenación, mientras que la actividad de peroxidasa total aumentaba durante la hipoxia por 24 h más 1 h de reoxigenación. Esto podría sugerir que, a pesar de la exposición del organismo a condiciones estresantes, la actividad de la CAT y de otras peroxidasa es capaz de mantener las concentraciones de H_2O_2 en niveles bajos.

7. CONCLUSIONES

En el presente estudio la actividad y expresión de la CAT mostraron respuestas tejido específicas en branquias y hepatopáncreas. La expresión relativa de CAT en branquias aumentó por efecto de la reoxigenación (28 °C) y la interacción reoxigenación-temperatura alta (35 °C), mientras que su actividad no mostró cambios significativos por los tratamientos de hipoxia, reoxigenación, temperatura alta o sus interacciones. El efecto en la expresión de CAT en branquias podría sugerir que el organismo se prepara para responder al aumento en la producción de peróxido de hidrógeno en la ventana de tiempo estudiado (24 h de hipoxia más 1 h de reoxigenación), mientras que la respuesta en la actividad de CAT no es detectable aún.

Por otro lado, en el hepatopáncreas, la expresión relativa de CAT no fue afectada por los tratamientos de temperatura alta y variación de oxígeno, en contraste, su actividad enzimática se vio estimulada por efecto de la temperatura alta (35 °C) en todas las condiciones de oxígeno. Las concentraciones de H₂O₂ en hepatopáncreas no sufrieron cambios significativos. Esto podría considerarse como el reflejo de la capacidad de la CAT para mantener las concentraciones de H₂O₂ y a su vez a la capacidad antioxidante del hepatopáncreas, tejido que posee gran actividad metabólica. Es importante recalcar que otras enzimas peroxidasa, como la GPx y peroxirredoxina, que también utilizan H₂O₂ como principal sustrato, podrían contribuir en mantener los niveles de H₂O₂ en niveles bajos durante la exposición a estresores ambientales.

8. REFERENCIAS

- An M.I. and Choi C.Y. 2010. Activity of antioxidant enzymes and physiological responses in ark shell, *Scapharca broughtonii*, exposed to thermal and osmotic stress: effects on hemolymph and biochemical parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 155(1): 34-42.
- Artigaud S., Lacroix C., Pichereau V. and Flye-Sainte-Marie J. 2014. Respiratory response to combined heat and hypoxia in the marine bivalves *Pecten maximus* and *Mytilus* spp. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 175: 135-140.
- Becker D., Brinkmann B.F., Zeis B. and Paul, R. 2011. Acute changes in temperature or oxygen availability induce ROS fluctuations in *Daphnia magna* linked with fluctuations of reduced and oxidized glutathione, catalase activity and gene (haemoglobin) expression. *Biology of the Cell*. 103: 351–363.
- Bertolo A., Pépino M., Adams J. and Magnan P. 2011. Behavioural thermoregulatory tactics in lacustrine brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Public Library of Science*. 6(4): e18603.
- Birben E., Sahiner U.M., Sackesenc C., Erzurum S. and Kalayci O. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*. 5(1): 9-19.
- Birnie-Gauvin K., Costantini D., Cooke S.J. and Willmore W.G. 2017. A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: a review. *Fish and Fisheries*. 18(5): 928-942.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72(1-2), 248-254.
- Breitburg D., Levin L.A., Oschlies A., Grégoire M., Chavez F.P., Conley D.J., Garçon V., Gutiérrez D., Isensee K., Limburg K.E., Montes I., Naqvi S.W.A., Pitcher G.C., Rabalais N.N., Roman M.R., Rose K.A., Seibel B.A., Telszewski M., Yasuhara M., Zhang J. and Jacinto G.S. 2018. Declining oxygen in the global ocean and coastal waters. *Science*. 359(6371): eaam 7240.
- Cao C., Leng, Y. and Kufe D. 2003. Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response. *Journal of Biological Chemistry*. 278(32): 29667-29675.
- Chelikani P., Fita I. and Loewen P.C. 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 61(2): 192-208.
- Chen N., Wu M., Tang G.P., Wang H.J., Huang C.X., Wu X.J., Wu H.Y., Zhang B., Huang C.H., Wang H.L., Liu H., Wang W.M. and Wang H.L. 2017. Effects of acute hypoxia and reoxygenation on physiological and immune responses and redox balance of Wuchang Bream (*Megalobrama amblycephala* Yih, 1955). *Frontiers in Physiology*. 8, 375.
- Choudhury F.K., Rivero R.M., Blumwald E. and Mittler R. 2017. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*. 90(5): 856-867.

- Clerch L.B. and Massaro D. 1992. Oxidation-reduction-sensitive binding of lung protein to rat catalase mRNA. *Journal of Biological Chemistry*. 267(5): 2853-2855.
- Cobo R. (2016). Parámetros genéticos y desempeño productivo en lotes de camarón *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) cultivados en cuba. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Marinas. Universidad de la Habana, Cuba.
- Currie R.W. and Tanguay R.M. 1991. Analysis of RNA for transcripts for catalase and SP71 in rat hearts after in vivo hyperthermia. *Biochemistry and cell biology*. 69(5-6): 375-382.
- Dash B., and Phillips T.D. 2012. Molecular characterization of a catalase from *Hydra vulgaris*. *Gene*. 501(2): 144-152.
- Da Silva-Castiglioni D., Oliveira G.T. and Buckup L. 2010. Metabolic responses of *Parastacus defossus* and *Parastacus brasiliensis* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) to hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 156(4): 436-444.
- Duan Y., Zhang J., Dong H., Wang Y., Liu Q. and Li H. 2015. Oxidative stress response of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* to *Vibrio parahaemolyticus* challenge. *Fish and Shellfish Immunology*, 46(2): 354-365.
- Duan Y., Zhang J., Dong H., Wang Y., Liu Q. and Li H. 2016. Effect of desiccation and resubmersion on the oxidative stress response of the kuruma shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*. 49: 91-99.
- Doyen P., Bigot A., Vasseur P. and Rodius F. 2008. Molecular cloning and expression study of pi-class glutathione S-transferase (pi-GST) and selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) transcripts in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*. 147(1): 69-77.
- Fennel K. and Testa J.M. 2019. Biogeochemical Controls on Coastal Hypoxia. *Annual Review of Marine Science*. 11:105-130.
- Friedrich J., Janssen F., Aleynik D., Bange H.W., Boltacheva N., Çagatay M.N., Dale A.W., Etiope G., Erdem Z., Geraga M., Gilli A., Gomoiu M.T., Hall P.O.J., Hansson D.Y., Holtappels M., Kirf M.K., Kononets M., Kononov S., Lichtschlag A., Livingstone D.M., Marinaro G., Mazlumyan S., Naeher S., North R.P., Papatheodorou G., Pfannkuche O., Prien R., Rehder G., Schubert C.J., Soltwedel T., Sommer S., Stahl H., Stanev E.V., Teaca A., Tengberg A., Waldmann C. Wehrli B. and Wenzhöfer F. 2014. Investigating hypoxia in aquatic environments: diverse approaches to addressing a complex phenomenon. *Biogeosciences*. 11(4): 1215-1259.
- Gainza O., Ramírez C., Ramos A.S. and Romero J. 2017. Intestinal microbiota of white shrimp *Penaeus vannamei* under intensive cultivation conditions in Ecuador. *Microbial Ecology*. 75(3):562-568.
- Gamble J. 1971. The Responses of the marine amphipods *Corophium rrenarium* and *C. volutator* to gradients and to choices of different oxygen concentrations. *Journal of Experimental Biology*. 54:275-290.
- García-Triana A., Zenteno-Savín T., Peregrino-Urriarte A.B. and Yepiz-Plascencia G. 2010. Hypoxia, reoxygenation and cytosolic manganese superoxide dismutase (cMnSOD)

silencing in *Litopenaeus vannamei*: effects on cMnSOD transcripts, superoxide dismutase activity and superoxide anion production capacity. *Developmental and Comparative Immunology*. 34(11): 1230-1235.

- García-Triana A., Peregrino-Uriarte A.B. and Yepiz-Plascencia G. 2016. Selenoprotein M gene expression, peroxidases activity and hydrogen peroxide concentration are differentially regulated in gill and hepatopancreas of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* during hypoxia and reoxygenation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 199: 14-20.
- Gieskes W.W.C., Laane R.W.P. and Ruardij P. 2015. Photo-oxidation: Major sink of oxygen in the ocean surface layer. *Marine Chemistry*. 177: 472-475.
- Giraud-Billoud M., Rivera-Ingraham G.A., Moreira D.C., Burmester T., Castro-Vazquez A., Carvajalino-Fernández J.M., Dafre A., Rosa R., Niu C., Tremblay N., Paital B., Storey J.M., Vega I.A., Zhang W., Yepiz-Plascencia G., Zenteno-Savin T., Storey K.B. and Hermes-Lima M. 2019. Twenty years of the 'Preparation for Oxidative Stress'(POS) theory: Ecophysiological advantages and molecular strategies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 234: 36-49.
- Gómez-Anduro G.A., Ascencio-Valle F., Peregrino-Uriarte A.B., Cámpa-Córdova A. and Yepiz-Plascencia G. 2012. Cytosolic manganese superoxide dismutase genes from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* are differentially expressed in response to lipopolysaccharides, white spot virus and during ontogeny. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*. 162(4): 120-125.
- González R. (2010). Fisiología térmica y despliegue diferencial en adultos de *Litopenaeus vannamei* sometidos a estrés térmico. Tesis Doctoral. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Baja California, México.
- Guo H., Li K., Wang W., Wang C. and Shen Y. 2017. Effects of copper on hemocyte apoptosis, ROS production, and gene expression in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Biological Trace Element Research*, 179(2): 318-326.
- Han S.Y., Wang M.Q., Wang, B.J., Liu M., Jiang K.Y. and Wang L. 2018. A comparative study on oxidative stress response in the hepatopancreas and midgut of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* under gradual changes to low or high pH environment. *Fish and Shellfish Immunology*. 11(76): 27-34.
- Harley C.D., Hughes A., Hultgren K.M., Miner B.G., Sorte C.J., Thornber C.S., Rodriguez L.F., Tomaneki L. and Williams S.L. 2006. The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology Letters*. 9(2): 228-241.
- Hermes-Lima M., Moreira D.C., Rivera-Ingraham G.A., Giraud-Billoud M., Genaro-Mattos T.C. and Campos É.G. 2015. Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: revisiting the proposal two decades later. *Free Radical Biology and Medicine*. 89: 1122-1143.
- Hopkin R.S., Qari S., Bowler K., Hyde D. and Cuculescu M. 2006. Seasonal thermal tolerance in marine Crustacea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 331(1): 74-81.

- Ighodaro O.M. and Akinloye O.A. 2017. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. 54(4): 287-293.
- Jena N.R. 2012. DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. Journal of Biosciences. 37(3): 503-517.
- Jia X., Wang F., Lu Y., Zhang D. and Dong S. 2014. Immune responses of *Litopenaeus vannamei* to thermal stress: a comparative study of shrimp in freshwater and seawater conditions. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology. 47(2): 79-92.
- Kidwell D.M., Lewitus A.J., Brandt S., Jewett E.B. and Mason D.M. 2009. Ecological impacts of hypoxia on living resources. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 381(1): S1-S3.
- Kim J., Kim S., An K.W., Choi C.Y., Lee S. and Choi K. 2010. Molecular cloning of *Daphnia magna* catalase and its biomarker potential against oxidative stresses. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology. 152(3): 263-269.
- Kohen R. and Nyska A. 2002. Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicologic Pathology. 30(6): 620-650.
- Krivoruchko A. and Storey K.B. 2013. Activation of the unfolded protein response during anoxia exposure in the turtle *Trachemys scripta* elegans. Molecular and Cellular Biochemistry. 374(1-2): 91-103.
- Kumlu M. and Turkmen S. 2010. Combined effects of temperature and salinity on critical thermal minima of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Penaeidae). Journal of Thermal Biology. 35(6): 302-304.
- Lara, C. (2012). Evaluación de un sistema cerrado para el cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora.
- Lavariás S., Heras H., Pedrini N., Tournier H. and Ansaldo M. 2011. Antioxidant response and oxidative stress levels in *Macrobrachium borellii* (Crustacea: Palaemonidae) exposed to the water-soluble fraction of petroleum. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology. 153(4): 415-421.
- Lavariás S., García C., Crespo R., Pedrini N. and Heras H. 2013. Study of biochemical biomarkers in freshwater prawn *Macrobrachium borellii* (Crustacea: Palaemonidae) exposed to organophosphate fenitrothion. Ecotoxicology and Environmental Safety. 96: 10-16.
- Li X., Fang P., Mai J., Choi E. T., Wang H. and Yang X.F. 2013. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. Journal of Hematology and Oncology. 6:19.
- Li Y., Wei L., Cao J., Qiu L., Jiang X., Li P., and Diao X. 2016. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme activities in the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) when exposed to hypoxia and reoxygenation. Chemosphere. 144: 234-240.
- Lushchak V.I., Lushchak L.P., Mota A.A. and Hermes-Lima M. 2001. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation.

American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 280(1): R100-R107.

- Lushchak V.I. and Bagnyukova T.V. 2006. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology. 143(1): 36-41.
- Lushchak V.I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquatic Toxicology. 101(1): 13-30.
- Madeira C., Leal M.C., Diniz M.S., Cabral H.N. and Vinagre C. 2018. Thermal stress and energy metabolism in two circumtropical decapod crustaceans: Responses to acute temperature events. Marine Environmental Research. 141: 148–158.
- Martínez-Canto O., Olguín-Monroy N.O., de Anda-Montañez J.A. and Zenteno-Savín T. 2013. Spatial and temporal variability of oxidative stress indicators in the red crab (*Pleuroncodes planipes*) from the west coast of the Baja California Peninsula, Mexico. Ciencias Marinas. 39(1): 41-53.
- Messner B. and Boll M. 1994. Cell suspension cultures of spruce (*Picea abies*): inactivation of extracellular enzymes by fungal elicitor-induced transient release of hydrogen peroxide (oxidative burst). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 39: 69-78.
- Mudagandur S.S., Gopalapillay G. and Vijayan K.K. 2016. Effect of salinity stress on gene expression in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. In Abiotic and biotic stress in plants-Recent advances and future perspectives. IntechOpen.
- Nakanishi K., Tajima F., Nakamura A., Yagura S., Ookawara T., Yamashita H., Suzuki K., Taniguchi N. and Ohno H. 1995. Effects of hypobaric hypoxia on antioxidant enzymes in rats. The Journal of Physiology. 489(P3): 869-876.
- Nishizawa J., Nakai A., Matsuda K., Komeda M., Ban T. and Nagata K. 1999. Reactive oxygen species play an important role in the activation of heat shock factor 1 in ischemic-reperfused heart. Circulation. 99(7): 934-941.
- Nogueira L., Mello D.F., Trevisan R., Garcia D., da Silva Acosta D., Dafre A. L. and de Almeida, E.A. 2017. Hypoxia effects on oxidative stress and immunocompetence biomarkers in the mussel *Perna perna* (Mytilidae, Bivalvia). Marine Environmental Research, 126: 109-115.
- Noone K.J., Sumaila U.R. and Diaz R.J. 2013. Managing Ocean Environments in a Changing Climate: Sustainability and Economic Perspectives. Elsevier. Primera edición. Burlington. 68-90.
- Noyola J., Mascaró M., Caamal-Monsreal C., Noreña-Barroso E., Díaz F., Re D., Sánchez A. and Rosas C. 2013. Effect of temperature on energetic balance and fatty acid composition of early juveniles of *Octopus maya*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 445: 156-165.
- Paital B. and Chainy G.B.N. 2014. Effects of temperature on complexes I and II mediated respiration, ROS generation and oxidative stress status in isolated gill mitochondria of the mud crab *Scylla serrata*. Journal of Thermal Biology. 41: 104–111.
- Parrilla D. (2011). Actividad enzimática y estrés oxidativo en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) infectado con el virus del síndrome de la mancha blanca (VSMB). Tesis de

maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, Baja California Sur.

- Parrilla-Taylor D.P. and Zenteno-Savín T. 2011. Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation. *Aquaculture*. 318(3-4): 379-38.
- Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29(9): e45.
- Pick E. and Keisari Y. 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal of Immunological Methods*. 38: 161-170.
- Pizzino G., Irrera N., Cucinotta M., Pallio G., Mannino F., Arcoraci V., Squadrito F., Altavilla D. and Bitto A. 2017. *Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. vol. 2017.
- Paulding W.R. and Czyzyk-Krzeska M.F. 2002. Hypoxia-Induced Regulation of mRNA Stability. In: Lahiri S., Prabhakar N.R., Forster R.E. (eds) *Oxygen Sensing*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. vol 475. Springer, Boston, MA
- Qiu J., Wang W.N., Wang L. J., Liu Y.F. and Wang A.L. 2011. Oxidative stress, DNA damage and osmolality in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* exposed to acute low temperature stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*. 154(1): 36-41.
- Re A.D., Díaz F., Ponce-Rivas E., Giffard I., Munoz-Marquez M.E. and Sigala-Andrade H.M. 2012. Combined effect of temperature and salinity on the thermotolerance and osmotic pressure of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Journal of Thermal Biology*. 37(6): 413-418.
- Rebolledo A.P. and Collin R. 2017. Thermal tolerance of the zoea I stage of four Neotropical crab species (Crustacea: Decapoda). *International Journal of Zoology*. 35: e14641.
- Rhee S.G., Yang K.S., Kang S.W., Woo H.A. and Chang, T.S. 2005. Controlled elimination of intracellular H₂O₂: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. *Antioxidants & redox signaling*. 7(5-6): 619-626.
- Ren X., Pan L. and Wang, L. 2015. Toxic effects upon exposure to benzo [a] pyrene in juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 39(1): 194-207.
- 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*. 226: 1-9.
- SAGARPA. 2017. Aumenta producción de camarón 65.5 por ciento en cuatro años. Ciudad de México. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- Sankar T.V., Patel D., Samuel R.S. and Amaranath G. 2018. Reducing the Impacts of Greenhouse Gases. In *Emerging Trends of Nanotechnology in Environment and Sustainability*. Springer, Cham. 13-20.

- Schmidtko S., Stramma L. and Visbeck M. 2017. Decline in global oceanic oxygen content during the past five decades. *Nature*. 542(7641): 335.
- Sies H. 2018. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Current Opinion in Toxicology*. 7: 122-126.
- Stickle W.B., Kapper M.A., Liu L.L., Gnaiger E. and Wang S.Y. 1989. Metabolic adaptations of several species of crustaceans and molluscs to hypoxia: tolerance and microcalorimetric studies. *The Biological Bulletin*. 177(2): 303-312.
- Tavares-Sánchez O.L., Gómez-Anduro G.A., Felipe-Ortega X., Islas-Osuna M.A., Sotelo Mundo R.R., Barillas-Mury C. and Yepiz-Plascencia G. 2004. Catalase from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: molecular cloning and protein detection. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 138(4): 331-337.
- Tehrani H.S. and Moosavi-Movahedi A.A. 2018. Catalase and its mysteries. *Progress in biophysics and molecular biology*. 140: 5-12.
- Trasviña, C. (2012). Caracterización del gen de catalasa del camarón *Litopenaeus vannamei* y su expresión en respuesta a hipoxia y reoxigenación. Tesis de maestría del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora.
- Trasviña-Arenas C.H., García-Triana A., Peregrino-Uriarte A.B. and 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.
- Tropea, C., Stumpf L. and Greco L.S.L. 2015. Effect of temperature on biochemical composition, growth and reproduction of the ornamental red cherry shrimp *Neocaridina heteropoda heteropoda* (Decapoda, Caridea). *Plos One*. 10(3): e0119468.
- Turrens J.F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*. 552(2): 335-344.
- Valavanidis A., Vlahogianni T., Dassenakis M. and Scoullou, M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 64(2): 178-189.
- Wang W.N., Zhou J., Wang P., Tian T.T., Zheng Y., Liu Y., Mai W. and Wang, A.L. 2009. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when exposed to acute pH stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 150(4): 428-435.
- Wang W.N., Li B.S., Liu J.J., Shi L., Alam M.J., Su, S.J., Wu J., Wang L. and Wang A.L. 2012. The respiratory burst activity and expression of catalase in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, during long-term exposure to pH stress. *Ecotoxicology*. 21(6): 1609-1616.
- Wang D., Li F., Chi Y. and Xiang J. 2012. Potential relationship among three antioxidant enzymes in eliminating hydrogen peroxide in penaeid shrimp. *Cell Stress and Chaperones*. 17(4): 423-433.
- Wang L., Wu J., Wang W.N., Cai D.X., Liu Y. and Wang A.L. 2012. Glutathione peroxidase from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: characterization and its Iregulation upon pH and Cd exposure. *Ecotoxicology*. 21:1585–1592.

- Welker A.F., Moreira D.C. and Hermes-Lima M. 2016. Roles of catalase and glutathione peroxidase in the tolerance of a pulmonate gastropod to anoxia and reoxygenation. *Journal of Comparative Physiology B*. 186(5): 553-568.
- Wieser R., Adam G., Wagne A., Schüller C., Marchler G., Ruis H., Krawiecs Z. and Bilinski, T. 1991. Heat shock factor-independent heat control of transcription of the CTT1 gene encoding the cytosolic catalase T of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 266(19): 12406-12411.
- Wu R.S.S. 2002. Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. *Marine Pollution Bulletin*. 45: 35–45.
- Xu Z., Regenstein J.M., Xie D., Lu W., Ren X., Yuan J. and Mao L. 2018. The oxidative stress and antioxidant responses of *Litopenaeus vannamei* to low temperature and air exposure. *Fish and shellfish immunology*. 72: 564-571.
- Yang H.T., Yang M.C., Sun, J.J., Guo F., Lan J.F., Wang X.W. and Wang J.X. 2015. Catalase eliminates reactive oxygen species and influences the intestinal microbiota of shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*. 47(1): 63-73.
- Zhang J., Gilbert D., Gooday A.J., Levin L., Naqvi S.W.A., Middelburg J.J., Scranton M. and Ekau W. 2010. Natural and human-induced hypoxia and consequences for coastal areas: synthesis and future development. *Biogeosciences*. 7: 1443–1467.
- Zhang P., Zhang X., Li J. and Huang G. 2006. The effects of body weight, temperature, salinity, pH, light intensity and feeding condition on lethal DO levels of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture*. 256(1-4): 579-587.
- Zheng J., Cao J., Mao Y., Su Y. and Wang J. 2019. Effects of thermal stress on oxidative stress and antioxidant response, heat shock proteins expression profiles and histological changes in *Marsupenaeus japonicus*. *Ecological Indicators*. 101: 780-791.
- Zhou J., Wang L., Xin Y., Wang W.N., He W.Y., Wang A.L. and Liu Y. 2010. Effect of temperature on antioxidant enzyme gene expression and stress protein response in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Thermal Biology*. 35(6): 284-288.