



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

**RESPUESTA TIPO WARBURG EN EL CAMARÓN BLANCO  
(*Litopenaeus vannamei*) ANTE UNA INFECCIÓN VIRAL O EN  
CONDICIONES DE HIPOXIA-REOXIGENACIÓN**

---

Por:

**Maria de los Angeles González Leyva**

TESIS APROBADA POR LA

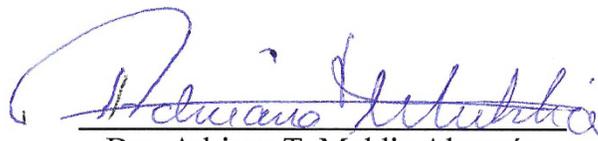
Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Maria de los Angeles González Leyva, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



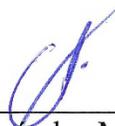
---

Dra. Adriana T. Muhlia Almazán  
Directora de Tesis



---

M.C. Karina García Orozco  
Integrante del comité de tesis



---

Dr. Adrián Hernández Mendoza  
Integrante del comité de tesis



---

Dr. Enrique De La Re Vega  
Integrante del comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Respuesta Tipo Warburg en el Camarón Blanco (*Litopenaeus vannamei*) Ante una Infección Viral o en Condiciones de Hipoxia-Reoxigenación” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Maria de los Angeles González Leyva, 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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por su apoyo económico al proyecto con clave 241670 y por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), en especial a la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal (CTAOA), por todas las facilidades brindadas para la realización de mis estudios.

Al gobierno federal mexicano, por haberme brindado la oportunidad de estudiar en este hermoso país.

A la Coordinación de Programas Académicos, a la Dra. Herlinda Soto Valdez y a su grupo de trabajo Laura E. García, Argelia Marín, Verónica Araiza y Héctor Galindo, por todo el apoyo ofrecido.

A la Dra. Adriana T. Muhlia Almazán, por recibirme en su laboratorio, por el tiempo dedicado y por contribuir en mi formación profesional y personal.

A cada uno de los miembros del comité de tesis: la M.C. Karina Orozco García, el Dr. Adrián Hernández Mendoza y el Dr. Enrique De la Re Vega. Muchas gracias por sus recomendaciones y por su disponibilidad.

Al Laboratorio de Referencia, Análisis y Diagnóstico en Sanidad Acuícola del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), campus Hermosillo, en especial al Dr. Arturo Sánchez Paz, la Dra. Tania Enríquez Espinoza, el M.C. Fernando Mendoza Cano y a Trini por toda su ayuda durante la realización de los bioensayos y en la determinación del glucógeno.

Al Laboratorio de Ecología Molecular del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS), en especial al Dr. Enrique De la Re Vega, por el apoyo brindado para realizar los trabajos de cuantificación del ATP.

A la M.C. Ofelia A. Méndez Romero y al M.C. Orlando Reyes Zamora por su valiosa ayuda durante los bioensayos y trabajos posteriores de evaluación de la expresión génica, cuantificación de lactato y determinación de la carga viral, sin su ayuda este trabajo no hubiera posible.

A la Q.B. Sandra Ruth Araujo Bernal, por su disponibilidad, su apoyo técnico y ayuda incondicional en todo el trabajo realizado en esta tesis.

A la M.C. Cintya Nevárez por su ayuda durante la cuantificación del glucógeno y también por ser una excelente compañera de laboratorio y una gran mujer.

Un especial agradecimiento a todos los amigos mexicanos que he hecho durante estos años: Martín Andrade, Isabel Clark, Miguel Camacho, Alejandro Fregoso, Rosa Luján, Cynthia Ramírez, Daniel Sastré y a Carmen Contreras, Osiris Álvarez y Fernando Ayala. Muchas gracias por ser parte de mi vida, por todo el cariño y todos los consejos.

A mis hermanos cubanos en Hermosillo con los cuales he compartido esta aventura: Orlando, Dailen, David, Félix y Yoandris, estoy muy feliz y agradecida de haberlos conocido.

A mi familia mexicana: Alma Campa, Karla Martínez, Maricarmen Recillas, Gerardo Reyna, Norma García y Jesús Manuel Herrera Cebreros (Cacho), muchísimas gracias por acogerme y hacerme sentir como en casa. No importa a dónde me lleve el futuro, pueden estar seguros de que ustedes son lo mejor que me llevo de México.

A mis amigos que están lejos, pero que me han apoyado a pesar de la distancia. Ustedes son mis estrellas en las noches oscuras y siempre los llevo en mi corazón. Gracias Yisi, Leo, Meily, Lia, Carine y Susy. Los quiero mucho.

A mi familia en Cuba, a mi hermano, a mis padres, mis abuelitos Ridelio, Ramón, Omelia y Miriam, ustedes son todo para mí, me han hecho lo que soy y me han dado todo su amor sin pedir nada a cambio. Un cariño muy especial para mi tía Arelis, mis tíos Chuchi y José Ángel, para Tere y para Bania, y sobre todo para Tania, Pochi, Manuel y tía Diana, ustedes me apoyaron cuando más lo necesité y de cierta manera, hicieron este día posible.

Por último, pero no menos importante, gracias a ti, mi amor. Sin ti no estaría aquí hoy, sin ti no hubiera tenido el valor de iniciar esta aventura. Tú me haces feliz en medio de la tormenta y eres lo más bonito que me ha pasado en la vida, muchas gracias por siempre estar a mi lado.

## DEDICATORIA

*A mi mamá, Arletis, porque lo ha dado todo por mí.*

*A mi papá, porque me ha enseñado a ser fuerte.*

*Y a mi esposo, Isaac, porque este es también su logro.*

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	6
<b>CONTENIDO</b> .....	7
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	9
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	11
<b>RESUMEN</b> .....	12
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	14
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	16
2.1. El Camarón Blanco, los Ciclos de Hipoxia-Reoxigenación y las Infecciones Virales.....	16
2.2. El Metabolismo de los Vertebrados y el Efecto Warburg.....	18
2.2.1. Antecedentes Históricos del Efecto Warburg.....	18
2.2.2. Efecto Warburg y el Metabolismo de las Células Tumorales.....	19
2.3. Respuestas Metabólicas del Camarón a Condiciones de Hipoxia-Reoxigenación y su Potencial Relación con el Efecto Warburg.....	20
2.4. Respuesta Metabólica de los Crustáceos al Virus del Síndrome de la Mancha Blanca y su Potencial Relación con el Efecto Warburg.....	25
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	29
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	30
4.1. Objetivos General.....	30
4.2. Objetivos Específicos.....	30
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	31
5.1. Efecto de la Infección con el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca en la Respuesta Metabólica de <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	31
5.1.1. Preparación del Inóculo del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca.....	31
5.1.2. Bioensayo de Infección con el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca.....	32
5.1.3. Confirmación de la Infección y Evaluación de la Carga Viral.....	33
5.2. Efecto de la Hipoxia-Reoxigenación en la Respuesta Metabólica de <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	34
5.2.1. Bioensayo de Hipoxia-Reoxigenación en <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	34
5.3. Cuantificación de L-lactato y Glucosa en el Plasma del Camarón.....	35
5.4. Cuantificación de Glucosa, Glucógeno y ATP en la Glándula Digestiva del Camarón.....	36

## CONTENIDO (continuación)

5.4.1. Determinación de Glucosa y Glucógeno en la Glándula Digestiva del <i>L. vannamei</i> .....	36
5.4.2. Cuantificación del ATP en la Glándula Digestiva del Camarón.....	38
5.5. Evaluación de la Expresión Absoluta del ARNm del Transportador GLUT1 ( <i>lvglut1</i> ) en la Glándula Digestiva del Camarón.....	39
5.5.1. Aislamiento, Cuantificación y Evaluación de la Integridad del ARN total....	39
5.5.2. Eliminación del ADN Genómico, Síntesis del ADNc y Amplificación del <i>lvglut1</i> .....	40
5.5.3. Cuantificación Absoluta del ARNm del <i>lvglut1</i> por qRT-PCR.....	42
5.6. Análisis Estadístico.....	43
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>44</b>
6.1. Cuantificación de la Carga Viral en los Camarones Inyectados con el WSSV.....	44
6.2. Cuantificación de L-lactato y Glucosa en el Plasma de Camarones Inyectados con el WSSV.....	45
6.3. Cuantificación de Glucosa, Glucógeno y ATP en la Glándula Digestiva de Camarones Inyectados con el WSSV.....	50
6.4. Evaluación de la Expresión Absoluta del ARNm del Transportador GLUT1 en la Glándula Digestiva de Camarones Inyectados con el WSSV.....	55
6.5. Cuantificación de L-lactato y Glucosa en el Plasma de Camarones Expuestos a Hipoxia-Reoxigenación.....	59
6.6. Cuantificación de Glucosa, Glucógeno y ATP en la Glándula Digestiva de Camarones Expuestos a Hipoxia-Reoxigenación.....	63
6.7. Evaluación de la Expresión Absoluta del ARNm del Transportador GLUT1 en la Glándula Digestiva de Camarones Expuestos a Hipoxia-Reoxigenación.....	68
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>75</b>
<b>8. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>76</b>
<b>9. REFERENCIAS.....</b>	<b>77</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>87</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Ciclo de vida y variaciones en la concentración de oxígeno disuelto que enfrenta el camarón blanco <i>L. vannamei</i> diariamente.....	17
2	Metabolismo energético de las células eucariotas en presencia o ausencia de oxígeno.....	21
3	Efecto de la hipoxia-reoxigenación en la expresión génica del factor 1 inhibidor de la ATPasa mitocondrial IF <sub>1</sub> en el camarón blanco <i>L. vannamei</i> .....	24
4	Estructura del WSSV obtenida por microscopía inmunoelectrónica. Viriones intactos vistos utilizando la metodología IEM.....	26
5	Cuantificación de la carga viral en hemocitos de camarones adultos <i>L. vannamei</i> durante el transcurso de la infección con el WSSV.....	44
6	Concentración de L-lactato en el plasma de camarones adultos <i>L. vannamei</i> infectados con el WSSV.....	46
7	Concentración de glucosa en el plasma de camarones adultos <i>L. vannamei</i> infectados con el WSSV. ....	47
8	Concentración de glucosa en la glándula digestiva de camarones adultos <i>L. vannamei</i> infectados con el WSSV.....	49
9	Concentración de glucógeno en la glándula digestiva de camarones adultos <i>L. vannamei</i> infectados con el WSSV. ....	51
10	Concentración de ATP en la glándula digestiva de camarones adultos <i>L. vannamei</i> infectados con el WSSV. ....	54
11	Integridad del ARN total aislado de la glándula digestiva de camarones adultos <i>L. vannamei</i> infectados con el WSSV.....	55
12	<b>A)</b> Eliminación del ADNg en el ARN total aislado de la glándula digestiva de camarones adultos <i>L. vannamei</i> infectados con el WSSV. <b>B)</b> Comprobación de la síntesis del ADNc. ....	56
13	Expresión del acarreador de glucosa <i>lvglut1</i> en la glándula digestiva de camarones adultos <i>L. vannamei</i> infectados con el WSSV.....	57
14	Concentración de L-lactato en el plasma de camarones juveniles <i>L. vannamei</i> expuestos a hipoxia-reoxigenación.....	60
15	Concentración de glucosa en el plasma de camarones juveniles <i>L. vannamei</i> expuestos a hipoxia-reoxigenación.....	61
16	Concentración de glucosa en la glándula digestiva de camarones juveniles <i>L. vannamei</i> expuestos a hipoxia-reoxigenación.....	64
17	Concentración de glucógeno en la glándula digestiva de camarones juveniles <i>L. vannamei</i> expuestos a hipoxia-reoxigenación.....	65

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

18	Concentración de ATP en la glándula digestiva de camarones juveniles <i>L. vannamei</i> infectados con el WSSV. ....	68
19	Integridad del ARN total aislado de la glándula digestiva de camarones juveniles <i>L. vannamei</i> expuestos a hipoxia-reoxigenación.....	69
20	<b>A)</b> Eliminación del ADNg en el ARN total aislado de la glándula digestiva de camarones juveniles <i>L. vannamei</i> expuestos a hipoxia-reoxigenación. <b>B)</b> Comprobación de la síntesis del ADNc.....	69
21	Expresión del acarreador de glucosa <i>lvglut1</i> en la glándula digestiva de camarones juveniles <i>L. vannamei</i> expuestos a hipoxia-reoxigenación.....	70
22	Mecanismo molecular propuesto para el efecto Warburg en el camarón blanco <i>L. vannamei</i> expuesto a hipoxia-reoxigenación o a la infección con el WSSV.....	73

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Oligonucleótidos específicos para el gen del acarreador de glucosa <i>lvglut1</i> ...	41

## RESUMEN

En México, el camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, está dentro de las especies con rendimientos económicos más elevados. Los dos principales factores que afectan seriamente el cultivo de esta especie son: los ciclos diarios de hipoxia-reoxigenación a los que está expuesto, y la infección con agentes patógenos como el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV). Estudios previos han sugerido que los camarones infectados con WSSV o expuestos a hipoxia-reoxigenación muestran respuestas específicas que pudieran estar asociadas con el “Efecto Warburg” de los vertebrados. Para elucidar dicho efecto en el camarón, en este estudio se evaluaron los cambios de las concentraciones plasmáticas de glucosa y L-lactato; se determinaron los niveles de glucógeno, glucosa, ATP, y la expresión absoluta del *lvglut1* en la glándula digestiva de camarones infectados con el WSSV o expuestos a condiciones de hipoxia-reoxigenación. Los resultados mostraron que a partir de las 12 h post-infección (hpi), el WSSV provocó un incremento significativo en la concentración plasmática de L-lactato, así como una disminución significativa en la concentración del glucógeno en los camarones infectados ( $p < 0.05$ ). Los niveles de glucosa en plasma, así como los de los metabolitos cuantificados en la glándula digestiva mostraron cambios significativos durante la infección con el WSSV ( $p < 0.05$ ). Por otra parte, se observó un aumento significativo del L-lactato en plasma, un incremento de 6 veces en el *lvglut1* y 1.4 veces en ATP durante la reoxigenación ( $p < 0.05$ ). Los valores de glucosa plasmática y del glucógeno disminuyeron significativamente desde las 6 h de hipoxia ( $p < 0.05$ ), manteniéndose constantes hasta las 12 h de reoxigenación; mientras que la glucosa en la glándula digestiva aumentó a las 6 h de hipoxia y posteriormente disminuyó a las 12 h ( $p < 0.05$ ), manteniéndose constante durante la reoxigenación. Los resultados obtenidos en los camarones expuestos al WSSV y bajo condiciones de hipoxia-reoxigenación, coinciden con las características de una respuesta tipo efecto Warburg en los vertebrados. Dicha respuesta podría representar una ventaja adaptativa que le permite al camarón enfrentar diferentes condiciones de estrés. El presente trabajo, es el primer estudio que describe la respuesta tipo efecto Warburg en condiciones hipoxia-reoxigenación en *L. vannamei*. Futuros estudios ayudarán a determinar características específicas adicionales de esta respuesta fisiológica del camarón blanco.

**Palabras claves:** ATP, glucosa, glucógeno, L-lactato, transportador de glucosa

## ABSTRACT

In Mexico, the white shrimp *Litopenaeus vannamei* is among the cultivated species that produce a high economic yield. Two factors seriously affect this species culture: the daily cycles of hypoxia-reoxygenation and diseases provoked by pathogens such as the white spot syndrome virus (WSSV). Early studies have reported that shrimp infected with WSSV or exposed to hypoxia-reoxygenation show specific responses associated with the "Warburg Effect" previously described in vertebrate cells. This study aimed to elucidate the existence of this effect in shrimp cells. The concentrations of plasma glucose and L-lactate were measured; also the glycogen, glucose, and ATP contents in the digestive gland and the absolute expression of the *lvglut1* gene were determined in shrimp infected with the WSSV or exposed to hypoxia-reoxygenation conditions. Results showed that after 12 hours post-infection (hpi), the WSSV causes a significant increase in plasma concentration of L-lactate ( $p<0.05$ ) and a significant decrease ( $p<0.05$ ) in the concentration of glycogen in infected shrimp. Plasma glucose levels and quantified metabolites in the digestive gland showed significant changes ( $p<0.05$ ) during infection with the WSSV. On the other hand, there was a significant increase in plasma L-lactate, a 6-fold increase in *lvglut1* and 1.4 times the ATP in the digestive gland during reoxygenation ( $p<0.05$ ). The plasma glucose and glycogen levels decreased significantly from 6 hours of hypoxia ( $p<0.05$ ), remaining constant until 12 hours of reoxygenation. Glucose levels in the digestive gland increased after 6 hours at hypoxia, and subsequently decreased at 12 hours, being constant during reoxygenation. Results indicate that shrimp responses after exposure to the WSSV or at hypoxia-reoxygenation conditions correspond to those that characterize a Warburg-like effect in vertebrate cells. This response could represent an adaptive advantage that allows the shrimp to face different stress conditions. To our knowledge, this is the first study describing this metabolic response at oxidative stress conditions. Further studies will determine some other specific characteristics of this shrimp specific physiological response.

**Keywords:** ATP, glucose, glycogen, L-lactate, glucose carrier

## 1. INTRODUCCIÓN

Los camarones se encuentran entre los crustáceos de mayor importancia económica a nivel mundial por sus altos índices de consumo. En el año 2017, México se ubicó en el séptimo lugar entre los principales países productores de camarón, con una producción de más de 228 mil toneladas (Pérez, 2012; SAGARPA, 2018). Entre las especies de camarón más cultivadas en México se encuentran el camarón café *Farfantepenaeus aztecus*, el camarón azul *Litopenaeus stylirostris* y el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (SAGARPA, 2018). En el 2009, el estado de Sonora produjo la mayor cantidad de camarón en el país, reportándose alrededor de 81,423 t de camarones obtenidas en las granjas de cultivo de Sonora. Sin embargo, entre el 2010 y 2011 se produjo una reducción de casi el 50% de la producción (40,000 t) debido a la presencia del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV, por sus siglas en inglés) (Industria Acuícola, 2012). A la fecha se reconoce que el WSSV causa el 100% de mortalidad entre los 2-10 días posteriores a la infección, por lo que se encuentra entre los factores que causan las mayores pérdidas económicas a este sector (Hernández-Palomares *et al.*, 2018).

La susceptibilidad de los camarones al WSSV y a otros patógenos se agrava con la constante exposición a variaciones cíclicas en la concentración de oxígeno disuelto en el agua (hipoxia y reoxigenación) en los estuarios y estanques de cultivo (Puente-Carreón, 2009). Se ha observado que en los estanques de cultivo del camarón blanco *L. vannamei* ocurren ciclos diarios de hipoxia-reoxigenación, alcanzándose las concentraciones más bajas cerca del amanecer (Ulaje-Fernández, 2015). Entre los factores que generan estas variaciones y que dificultan el desarrollo óptimo de los camarones se encuentran: 1) la alta densidad de organismos, y 2) la modificación de factores químicos del agua marina como el pH, concentración de nitratos, generación de oxígeno a través de la fotosíntesis realizada por las micro-algas durante el día, y la disminución de estos niveles durante la ausencia de luz, debido principalmente a la respiración de los organismos (Chimeo-Núñez *et al.*, 2015; Moreno-Figueroa, 2017). Así el resultado de las amplias variaciones en el oxígeno ambiental (0.77 – 16.7 mg/L) impacta en la reducción de la frecuencia de muda y el crecimiento retardado de los camarones (Ahuejote-Sandoval, 2004; Flores, 2018).

En 2011, Chen y colaboradores (2011) sugirieron que en presencia de la infección con el WSSV, el camarón blanco presenta una respuesta metabólica semejante a la del efecto Warburg descrita

en los vertebrados. Posteriormente, Chimeo-Núñez (2017) observó respuestas similares en los organismos expuestos a un evento de hipoxia-reoxigenación, sugiriendo a su vez la existencia de una respuesta tipo efecto Warburg en camarones sanos expuestos a condiciones de estrés oxidativo (Chen *et al.*, 2011; Chimeo-Núñez, 2017).

El efecto Warburg ha sido caracterizado y reportado principalmente en humanos con patologías como tumores cancerígenos y durante la proliferación celular (Warburg, 1956; Colombo *et al.*, 2010). La respuesta metabólica del tipo Warburg se caracteriza por niveles estables de glucosa a expensas de las reservas de glucógeno, altas concentraciones de lactato aún en presencia de oxígeno ambiental y la sobreexpresión de los transportadores de glucosa de alta afinidad (GLUT1 y GLUT3) (Warburg, 1956; De Alteriis *et al.*, 2018).

Estudios previos realizados en camarones sometidos a condiciones de hipoxia y reoxigenación, han evidenciado la sobreexpresión de los transcritos correspondientes a los transportadores de glucosa *lvglut1* y *lvglut2*, así como el aumento de L-lactato, (Soñáñez-Organis *et al.*, 2010; Martínez-Quintana *et al.*, 2014; Martínez-Quintana *et al.*, 2015). Sin embargo, los estudios realizados en el camarón blanco que sugieren la presencia de una respuesta metabólica del tipo Warburg han sido realizados en organismos infectados con el WSSV (Chen *et al.*, 2008; 2009; 2011; Hernández-Palomares *et al.*, 2018). A la fecha, la presencia de una respuesta de este tipo no ha sido confirmada o caracterizada bajo otras condiciones de estrés como son los ciclos de hipoxia-reoxigenación. Lo anterior evidencia la falta de conocimiento básico sobre el estudio del metabolismo del camarón, pues aún se desconoce si la respuesta metabólica tipo efecto Warburg que muestran los organismos es una respuesta fisiológica específica a la infección viral o es una respuesta general ante condiciones de estrés.

En base a lo anterior, este estudio tiene como objetivo demostrar que las respuestas metabólicas del camarón blanco sometido a estrés oxidativo (hipoxia-reoxigenación) o a la infección con el WSSV, coinciden con las del efecto Warburg en vertebrados.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. El Camarón Blanco, los Ciclos de Hipoxia-Reoxigenación y las Infecciones Virales

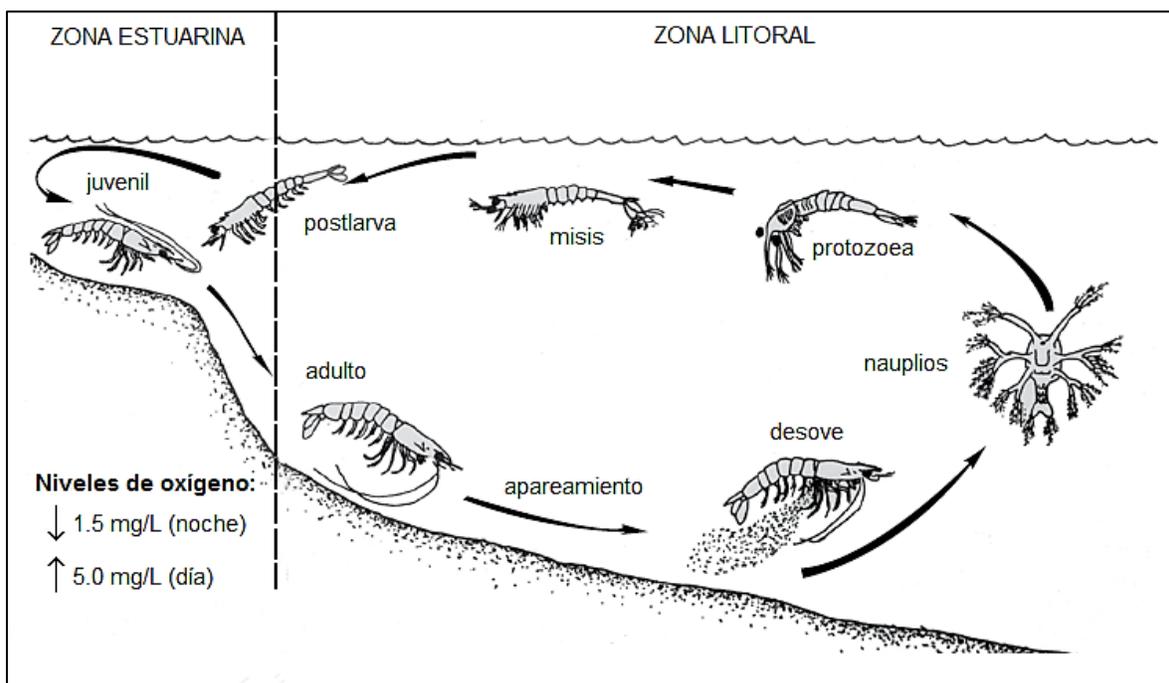
La acuicultura es una de las actividades productivas que a nivel mundial ha tenido una mayor expansión en las últimas cuatro décadas. En el año 2017, la producción mundial de la acuicultura ascendió a 80 millones de toneladas aproximadamente, representando un valor estimado de más de 237 mil millones de USD (FAO, 2017). Dentro de la acuicultura, el cultivo de camarón aporta anualmente alrededor de 5.5 millones de toneladas, y en el 2017 representó el 14% del valor de todos los productos acuícolas comercializados en el mercado internacional (FAO, 2017). En el 2017, México aportó 228 mil toneladas de camarón, ubicándose en el séptimo lugar en producción a nivel mundial (SAGARPA, 2018). En México, el cultivo del camarón inició a principios de la década de los 70's y en los últimos 10 años presentó una tasa media de crecimiento anual de la producción del 6.24% (INAPESCA, 2018). Entre las especies más cultivadas en México se encuentran el camarón café (*Farfantepenaeus aztecus*), el azul (*Litopenaeus stylirostris*) y el blanco (*Litopenaeus vannamei*) (FAO, 2017; SAGARPA, 2018).

El camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* es una especie de camarón peneido que se encuentra distribuido en las zonas costeras comprendidas entre México y Perú (Ahuejote-Sandoval, 2004). Los adultos viven y se reproducen en el mar abierto, mientras que las postlarvas migran cerca de las costas a zonas de refugio hasta alcanzar su etapa juvenil y pre-adulta en estuarios, lagunas costeras y manglares, por lo que durante su ciclo de vida los camarones se encuentran en fondos fangosos con profundidades que varían entre los 0 y 50 m (Wyban y Sweeney, 1993). Lo anterior conlleva a que esta especie durante su desarrollo esté expuesta a condiciones fluctuantes en la concentración de oxígeno disuelto en el agua, mayoritariamente en las zonas someras (Figura 1).

Durante su estadio como post-larvas, los camarones migran a los estuarios, los cuales funcionan como zonas de crianza que confieren protección contra los depredadores. En estos sitios, que son cuerpos de agua someros al igual que los estanques de cultivo, se pueden presentar ciclos diurnos de normoxia-hipoxia. Se ha registrado que durante el día las concentraciones de oxígeno disuelto

en el agua aumentan, debido principalmente a la fotosíntesis realizada por las micro-algas. Sin embargo, durante la noche la concentración del oxígeno disuelto disminuye hasta llegar a niveles menores de 5 mg/L (normoxia), a partir del cual se considera como hipoxia ambiental (Flores *et al.*, 2018; Amado-Álvarez *et al.*, 2019). Se sabe que para *L. vannamei* el rango de tolerancia reportado respecto al oxígeno disuelto en el agua marina, se encuentra entre los 2 y 5 mg/L (Puente-Carreón, 2009). La disminución en la concentración de oxígeno disuelto en el agua es resultado de la respiración de los organismos que consumen el oxígeno que se produjo por la fotosíntesis durante el día y del exceso de materia orgánica en descomposición que se encuentra en los estuarios (Puente-Carreón, 2009).

Actualmente, se cuenta con evidencia que confirma que los ciclos de hipoxia-reoxigenación pueden afectar la capacidad de respuesta inmune de los camarones, incrementando su susceptibilidad a distintas enfermedades virales como el Síndrome de Deformidad Runt (RDS), el Síndrome del Taura (TS) y el Síndrome de la Mancha Blanca (Perazzolo *et al.*, 2002).



**Figura 1.** Ciclo de vida y variaciones diarias en la concentración de oxígeno disuelto que enfrenta el camarón blanco *L. vannamei*. Tomado y modificado de King (2013) y Puente-Carreón (2009).

Dentro de los agentes virales que afectan al camarón, el virus del síndrome de la mancha blanca tiene un alto índice de patogenicidad y provoca una enfermedad asociada con mortalidades masivas en América Central, generando mortalidades acumuladas del 100% entre los 2-10 días posteriores a la infección (Puente-Carreón, 2009; Rodríguez-Villa, 2015; Hernández-Palomares *et al.*, 2018). Desde la aparición del virus en el año 1992 en Taiwán (Sánchez-Paz, 2010), se estiman pérdidas por un valor de 8-15 mil millones de dólares americanos, aumentando progresivamente en aproximadamente 1,000 millones anualmente (Flegel *et al.*, 2008; Stentiford *et al.*, 2012). Por lo anterior esta enfermedad representa hoy en día, uno de los principales problemas que enfrenta la camaronicultura a nivel mundial.

## 2.2. El Metabolismo de los Vertebrados y el Efecto Warburg

### 2.2.1. Antecedentes Históricos del Efecto Warburg

En 1924, Otto Warburg y colaboradores descubrieron que las células cancerígenas, a diferencia de las células sanas de tejidos adyacentes, consumen enormes cantidades de glucosa que es degradada a lactato por la vía anaerobia, pero en presencia de oxígeno. El Dr. Warburg propuso que existen disfunciones en las mitocondrias de estas células que pudieran ser el origen de la “glucólisis aeróbica” y que este fenómeno es la principal causa del cáncer (Warburg, 1956).

Posteriormente en 1929, el bioquímico inglés Herbert Crabtree estudió la heterogeneidad de la glucólisis en los diferentes tipos de tumores y confirmó los hallazgos de Warburg. Sin embargo, descubrió también que la magnitud de la respiración en los tumores es variable y que la glucólisis aeróbica en células cancerígenas podía observarse aun cuando las mitocondrias estén activamente funcionando (Díaz-Ruíz *et al.*, 2011). Así se definió un efecto a corto plazo o efecto Crabtree, caracterizado por el cambio reversible de la respiración a la fermentación y considerado como un evento previo a la reprogramación metabólica a largo plazo que implica el efecto Warburg.

### 2.2.2. Efecto Warburg y el Metabolismo de las Células Tumorales

Como se mencionó anteriormente, las células cancerígenas consumen gran cantidad de glucosa y presentan altos flujos glucolíticos, los cuales pueden ser explicados por el aumento de la actividad de las enzimas que participan en la ruta de la glucólisis (Pelicano *et al.*, 2006). Por otra parte, en estas células se observa también un aumento en la producción de lactato, mismo que puede deberse a una restricción del uso del piruvato por las mitocondrias (Lu *et al.*, 2015). Este aumento en las concentraciones de lactato puede ser el resultado de tres eventos: la restricción del transporte del piruvato a la matriz mitocondrial, la inhibición de la actividad del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) y la sobreexpresión de la lactato deshidrogenasa (Díaz-Ruíz *et al.*, 2011). Todo lo anterior sugiere que el efecto Warburg resulta de cambios en la expresión de los genes que codifican para al menos catorce enzimas, las cuales se describirán posteriormente, que están involucrados en la “glucólisis aeróbica” (Díaz-Ruíz *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2015).

Dentro de las respuestas celulares que caracterizan al efecto Warburg en las células cancerígenas de los vertebrados se encuentran la sobreexpresión de los transcritos de diversas proteínas como son los transportadores de glucosa de alta afinidad (GLUT1 y GLUT3), la hexocinasa II (HK II), las isoformas L y P de la fosfofructocinasa-1 (PFK-1), la isoforma B3 de fosfofructocinasa-2 (PFK-2), la isoforma M2 de la piruvato cinasa (PK), la lactato deshidrogenasa (LDH) y la piruvato deshidrogenasa cinasa (PDHK) (Gogvadze *et al.*, 2010). También se han reportado alteraciones en la actividad del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) en la membrana externa mitocondrial, así como el incremento en la producción de acetoina, un subproducto de la descarboxilación no oxidativa del piruvato, que inhibe a la enzima piruvato deshidrogenasa. Otras modificaciones abarcan la presencia de mutaciones en la succinato deshidrogenasa (SDH), una disminución de la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales I, III y IV; y además un decremento en la actividad de la ATPasa debido a la sobreexpresión del inhibidor IF<sub>1</sub> (Díaz-Ruíz *et al.*, 2011).

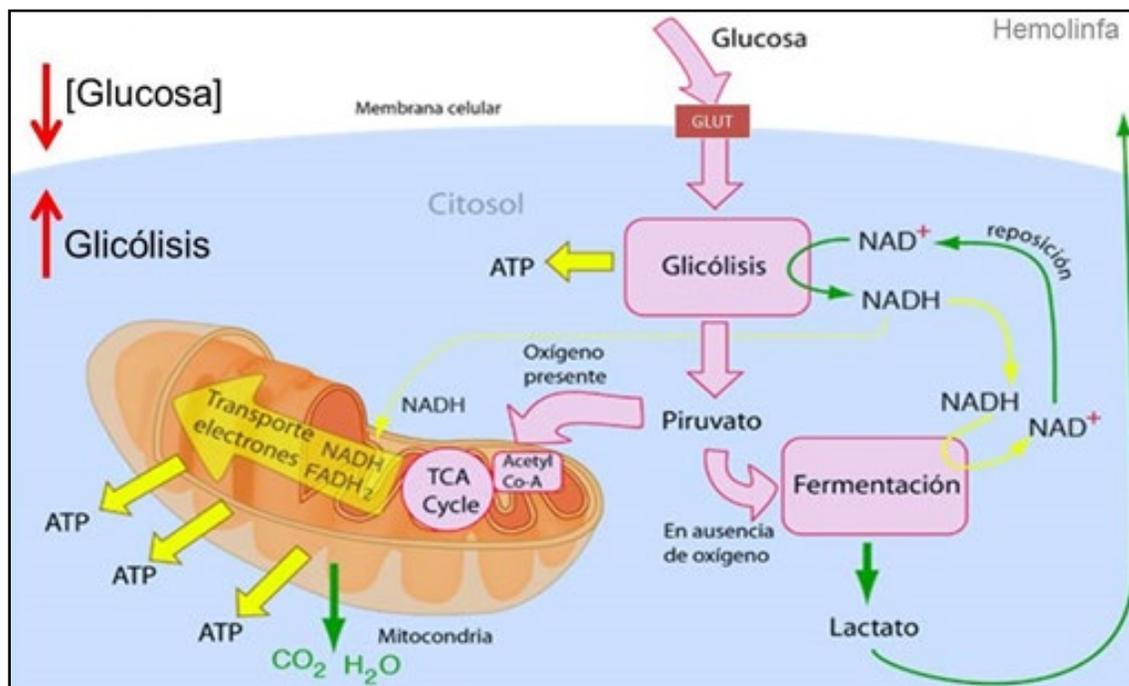
De todas las respuestas anteriores registradas en las células de los vertebrados, se ha propuesto que la sobreexpresión de los transportadores de glucosa es uno de los principales determinantes para el efecto Warburg (Díaz-Ruíz *et al.*, 2011). En el 2005, Macheda y colaboradores encontraron que los transportadores de glucosa de alta afinidad (GLUT1 y GLUT3) están sobreexpresados en varias

líneas celulares cancerígenas. Se han realizado estudios que demuestran que el silenciamiento del gen que codifica para el transportador GLUT1 se relaciona con una proliferación significativamente reducida, debido a una menor resistencia a la apoptosis, en al menos 78 melanomas primarios humanos, hepatocarcinomas y líneas celulares HeLa, (Gruenewald *et al.*, 2015; Koch *et al.*, 2015). La disminución en la proliferación tumoral se debe a que un mayor número de células entran en un estado de muerte celular programada, y en las células tumorales en donde el transcrito del GLUT1 ha sido silenciado, hay una menor proliferación que en aquellas que presentan el GLUT1 expresado. Lo anterior demuestra el papel crucial de este transportador promoviendo la absorción de glucosa y el crecimiento celular, lo cual en células cancerígenas se relaciona con una mayor agresividad tumoral y el desarrollo del efecto Warburg. Además de los vertebrados, hasta la fecha sólo se ha caracterizado el efecto Warburg en células tumorales o altamente proliferativas de *Plasmodium* y levaduras (Díaz-Ruíz *et al.*, 2011; Jacot *et al.*, 2016). Las células tumorales son por definición células altamente proliferativas que presentan un incremento en la absorción y el metabolismo de los nutrientes para promover la supervivencia y el crecimiento celular (Courtney *et al.*, 2015). La constante replicación de las células tumorales provoca que durante el desarrollo de los tumores sólidos se genere un microambiente donde el centro de la aglomeración celular se encuentra en condiciones de hipoxia, mientras las células periféricas tienen un suministro constante de oxígeno. Los diferentes microambientes en los tumores sólidos y la alta demanda de nutrientes que presentan las células cancerígenas determinan el desarrollo de respuestas metabólicas como el efecto Warburg que permite que las células tumorales se adapten y desarrollen con cierta independencia del suministro de oxígeno y de la producción de ATP mediante la fosforilación oxidativa en la mitocondria (Gogvadze *et al.*, 2010; Courtney *et al.*, 2015).

### 2.3. Respuestas Metabólicas del Camarón a Condiciones de Hipoxia-Reoxigenación y su Potencial Relación con el Efecto Warburg

Como se mencionó previamente, tanto en el ambiente natural como en las granjas de cultivo, los camarones están expuestos constantemente al estrés oxidativo que provocan bajas concentraciones

de oxígeno disuelto en el agua (Re *et al.*, 2004). Este fenómeno es conocido como hipoxia y se define como una concentración de oxígeno disuelto en el agua marina menor a 5 mg/L (Cisterna *et al.*, 2008; Flores *et al.*, 2018; Amado-Álvarez *et al.*, 2019). Por el contrario, la reoxigenación se refiere al restablecimiento de los niveles de oxígeno ambiental después de un evento hipóxico. Se sabe que la tolerancia a la hipoxia varía según la especie, en el caso del camarón blanco *L. vannamei*, se ha reportado como una especie tolerante a la hipoxia que puede sobrevivir dentro de un rango de 2 a 5 mg/L; mientras que los niveles mínimos letales oscilan entre 0.2 a 1.27 mg/L (Zhang *et al.*, 2006). Sin embargo, en esta especie, al igual que en otros crustáceos, los ciclos de hipoxia y reoxigenación afectan al crecimiento, sobrevivencia, conducta, muda, alimentación y sistema inmune de los organismos, quienes modifican su metabolismo energético para adaptarse a estas condiciones de estrés (Ahuejote-Sandoval, 2004; Belley *et al.*, 2010).



**Figura 2.** Metabolismo energético de las células eucariotas en presencia o ausencia de oxígeno. Tomado y modificado de <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbasees/Biology/celres.html>.

Cuando las células eucariotas están expuestas a condiciones de hipoxia disminuye la producción de ATP, ya que la fosforilación oxidativa se ve afectada, puesto que depende de la formación de

un gradiente de protones en el espacio intermembrana de la mitocondria. Este gradiente es producido por la cadena de transporte de electrones localizada en la membrana interna mitocondrial, la cual está compuesta por cuatro complejos proteicos multiméricos y dos transportadores independientes (ubiquinona y citocromo *c*). Estos transportadores transfieren los electrones provenientes del NADH y el FADH<sub>2</sub> hasta el oxígeno que funciona como aceptor final de electrones. Es así como la disminución en la concentración de oxígeno ambiental afecta la disipación del gradiente electroquímico y por tanto, el cese de la producción de ATP (Alberts *et al.*, 2010), en estas condiciones y para restablecer los niveles basales de ATP, la glucólisis se estimula y una mayor cantidad de glucosa es metabolizada hacia lactato por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). La acumulación del lactato en el citosol provoca la disminución del pH y este es exportado fuera de la célula elevando su concentración en la hemolinfa (Gogvadze *et al.*, 2010), razón por la cual, este incremento es utilizado como indicador de que se está llevando a cabo un metabolismo anaerobio a nivel celular (Figura 2). Por otra parte, la producción de ATP por la vía anaeróbica es muy poco eficiente ya que, por cada molécula de glucosa degradada, sólo se obtienen 2 ATPs, que comparados con la producción de 36 ATPs por la vía aeróbica, resulta ser muy ineficiente provocando un rápido agotamiento de las reservas celulares de glucosa (Vázquez *et al.*, 2010).

A pesar de todo el conocimiento relacionado con el efecto Warburg, los mecanismos y las moléculas que participan en esta respuesta metabólica en los crustáceos es aún muy escaso. Estudios previos han reportado que la glucosa es almacenada en forma de glucógeno en la glándula digestiva, músculo y branquias para ser utilizada ante un aumento de la demanda energética (Ulaje-Fernández, 2015). Se sabe que debido a que la glucosa no puede difundir a través de la membrana plasmática, su entrada a la célula se lleva a cabo a través de los transportadores de glucosa (GLUT), cuya expresión génica aumenta bajo condiciones de alta demanda energética (Hernández-Díaz y Herrera-Burgos, 2002).

Los transportadores GLUT están encargados del ingreso de los monosacáridos a todas las células del organismo y en los mamíferos se han identificado al menos trece de ellos (Hernández-Díaz y Herrera-Burgos, 2002). En el camarón blanco, sin embargo, sólo se ha reportado la presencia de dos transportadores, GLUT1 y GLUT2, mismos que se sobreexpresan en la glándula digestiva y las branquias cuando el organismo ha sido sometido a condiciones de hipoxia (Martínez-Quintana *et al.*, 2014; Martínez-Quintana *et al.*, 2015; Martínez-Quintana *et al.*, 2016). En el caso del

GLUT1, Martínez-Quintana *et al.* (2014, 2016) sugirieron que la actividad de dicho transportador es tejido-específica, debido a que en la glándula digestiva promueve el movimiento de la glucosa desde la célula hacia el medio extracelular durante la hipoxia, mientras que en las branquias participa en el transporte de la glucosa desde el plasma hacia el interior celular.

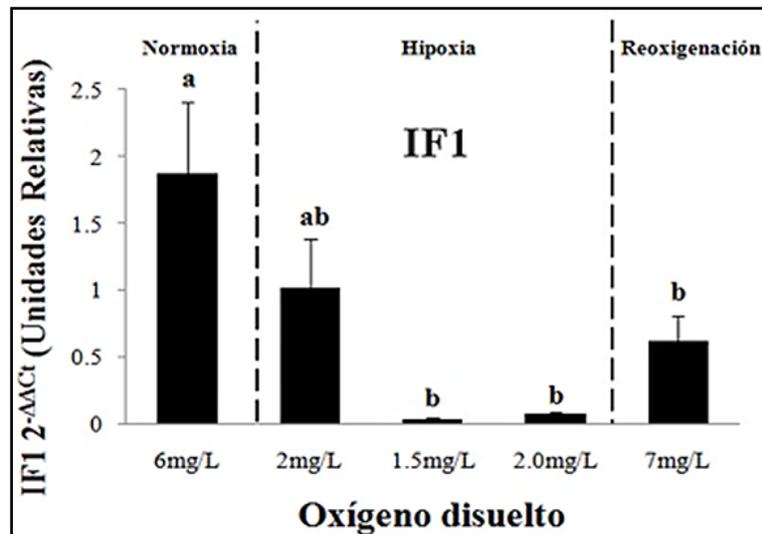
Además de la hipoxia y sus efectos, el fenómeno de reoxigenación, también conocido como reperfusión, ha sido ampliamente descrito en los vertebrados. Dentro de las múltiples respuestas metabólicas reportadas ante este fenómeno se encuentran la sobrecarga de calcio citosólico, la disfunción endotelial y la apertura del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPM). Se sabe que como resultado de la transición de la permeabilidad y la ruptura de las membranas mitocondriales hay liberación del citocromo *c* y esto activa a las caspasas iniciando la apoptosis celular, provocando la hipercontracción miofibrilar, fragilidad del citoesqueleto y ruptura de la membrana plasmática (Loor *et al.*, 2011).

Se sabe que después de un evento hipóxico tanto en los vertebrados como en los camarones, durante la primera hora de reoxigenación, ocurre un aumento en los niveles de L-lactato con valores similares a los de la hipoxia (Ulaje-Fernández, 2015; Chimeo-Núñez, 2017). Este fenómeno se debe a que la reoxigenación afecta la actividad de la piruvato deshidrogenasa mitocondrial (PDH), cuya función es regular la conversión de piruvato a acetil-CoA (Rao *et al.*, 2001) y la acidosis láctica provocada por la hipoxia, ocasiona un retraso en la recuperación del metabolismo aerobio. En los vertebrados se ha reportado que en la cadena respiratoria mitocondrial, la reoxigenación provoca una disfunción de los complejos mitocondriales como la NADH deshidrogenasa (complejo I) y la citocromo *c* oxidorreductasa (complejo III) de la cadena de transporte de electrones; el exceso repentino de oxígeno molecular provoca un incremento en la producción de anión superóxido y especies reactivas de oxígeno (EROs) disminuyendo la reducción de este por el complejo citocromo *c* oxidasa (Martínez-Cruz *et al.*, 2017). En carcinomas humanos se ha reportado que el incremento en las EROs provoca un aumento en la expresión del factor 1 inhibidor de la ATPasa (IF<sub>1</sub>), sugiriéndose que en las células cancerígenas una sobreexpresión del IF<sub>1</sub> mejora la proliferación y supervivencia celular, mediante el desarrollo del efecto Warburg (Sánchez-Aragó *et al.*, 2013; Tran *et al.*, 2016).

En los crustáceos, el inhibidor IF<sub>1</sub> ha sido descrito únicamente en el camarón blanco *L. vannamei*, y se reportó una disminución en los niveles del transcrito de IF<sub>1</sub> durante la exposición a condiciones de hipoxia y reoxigenación, encontrándose una tendencia a incrementar durante la reoxigenación

como se observa en la Figura 3 (Chimeo-Núñez *et al.*, 2015). Los camarones están expuestos a ciclos diarios de hipoxia-reoxigenación a en los estuarios y granjas de cultivo camaronícolas (Chimeo-Núñez *et al.*, 2015; Moreno-Figueroa, 2017), como se mencionó previamente durante la reoxigenación ocurre un aumento en la producción de EROs, lo cual pudiera provocar alteraciones en la expresión del IF<sub>1</sub> que propiciarán el desarrollo de una respuesta tipo efecto Warburg en los camarones expuestos a hipoxia y posterior reoxigenación.

Los ciclos diarios de hipoxia-reoxigenación en los estuarios y granjas de cultivo camaronícolas, constituyen factores de estrés que provocan afectaciones en el crecimiento, sobrevivencia, alimentación, muda, comportamiento y en la capacidad respiratoria de los camarones peneidos (Chimeo-Núñez *et al.*, 2015). Todo lo anterior aumenta la vulnerabilidad de los camarones a los agentes infecciosos presentes en el agua de mar como es el caso del WSSV.



**Figura 3.** Efecto de la hipoxia-reoxigenación en la expresión génica del factor 1 inhibidor de la ATPasa mitocondrial IF<sub>1</sub> en el camarón blanco *L. vannamei*. Tomado de Chimeo-Núñez *et al.* (2015).

## 2.4. Respuesta Metabólica de los Crustáceos al Virus del Síndrome de la Mancha Blanca y su Potencial Relación con el Efecto Warburg

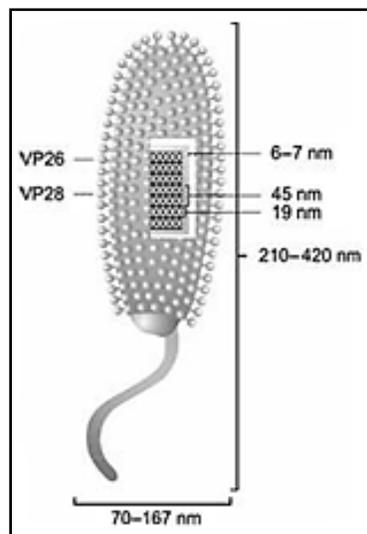
En la actualidad se han reportado más de 20 virus que afectan a los crustáceos, uno de éstos es el virus del síndrome de la mancha blanca, agente causante del síndrome del mismo nombre (Rodríguez-Villa, 2015). La presencia del WSSV se detectó por primera vez en Taiwán en 1992 y el primer caso diagnosticado en América ocurrió en 1995, en una granja camaronera del Sur de Texas, originándose la infección probablemente a través de un producto de camarón congelado que fue importado de Asia. El WSSV se ha encontrado en organismos vivos, en productos congelados de camarón y en los suelos de granjas que presentaron la infección (Sánchez-Paz, 2010). En febrero de 1999, el virus causó mortalidades masivas en las granjas camaronícolas en Ecuador, mientras que el brote más reciente, en un área con estatus libre de WSSV según los criterios de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), ocurrió en Brasil en 2005 (Sánchez-Paz, 2010; Maldonado *et al.*, 2016).

El proceso de infección con el WSSV inicia con un período de latencia asintomático durante el cual se replica el virus en los tejidos blanco como la hemolinfa y las branquias, posteriormente se desarrolla una infección sintomática aguda (Mejías y Navarro, 2013). El tiempo de duración de cada etapa de la infección depende de la patogenicidad de la cepa del WSSV, de la carga viral inicial y del estado fisiológico de los organismos (Mejías y Navarro, 2013; Maldonado *et al.*, 2016). Entre los síntomas que presentan los camarones infectados se encuentran la letargia, el nado errático y la reducción repentina en el consumo de alimentos, provocando una reducción del valor económico de los organismos (Li *et al.*, 2016).

La replicación viral a nivel de hemolinfa ocurre en los hemocitos, lo cuales son las células efectoras del sistema inmune en los crustáceos y por tanto la replicación del WSSV en estas células afecta la capacidad de los camarones de contrarrestar la infección (Hernández-Pérez, 2012). Por otra parte, la replicación del virus en las branquias provoca alteraciones en el proceso de osmorregulación y afecta el adecuado suministro de oxígeno hacia la hemolinfa (Ramos-Carreño, 2010); lo anterior, favorece el deterioro de los organismos tanto por la disminución de la presión parcial del oxígeno en el plasma de los camarones infectados, como por la escasez de nutrientes debido a la reducción en el consumo de alimentos. Otra característica importante del WSSV es su elevada capacidad para

infectar a más de 93 especies de artrópodos, los cuales actúan como vectores y/o reservorios que contribuyen a la propagación del virus en las instalaciones camaronícolas y en el medio silvestre (Li *et al.*, 2016).

El WSSV está clasificado dentro del género *Whispovirus* de la familia *Nimaviridae* (Manimaran *et al.*, 2018). Los viriones del WSSV son de un tamaño aproximado de 210 - 420 nm de longitud y 70-167 nm de diámetro, con forma baciliforme y un apéndice en uno de sus extremos (Figura 4). La envoltura viral está compuesta aparentemente por una membrana lipídica de 6-7 nm de espesor y la superficie de la nucleocápside está compuesta por 15 hélices verticales y estriaciones de 19 x 80 y 8 x 80 nm, respectivamente (Kim *et al.*, 2014). Su genoma consiste en 305 kb de ADN circular bicatenario y cuenta con aproximadamente 180 marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés *open reading frame*) (Sánchez-Paz, 2010). El genoma del WSSV (número de acceso del GenBank: AF440570) cuenta con sólo el 5% de las secuencias estudiadas, siendo la mayoría proteínas de reconocimiento e interacción entre el hospedero y el virus (Yi *et al.*, 2004; Sánchez-Paz, 2010).



**Figura 4.** Estructura del WSSV obtenida por microscopía inmunoeléctronica. Viriones intactos utilizando la metodología IEM (*immunolectron microscopy*, por sus siglas en inglés). Tomado de Sánchez-Paz (2010).

En un proceso infeccioso viral, el paso crucial en la transmisión de la enfermedad es la entrada del patógeno a la célula hospedera, ya que de ésta dependen los posteriores pasos de replicación y propagación del patógeno. En este proceso las proteínas de la envoltura viral y las proteínas de la superficie del huésped juegan un papel crucial en la infección. El WSSV posee 58 proteínas estructurales y la mayoría de ellas intervienen en el proceso de reconocimiento (Sánchez-Paz, 2010; Huang *et al.*, 2015). A la fecha se ha reportado que siete proteínas de la envoltura, entre ellas VP53A y PmCBP, interactúan con el transportador GLUT1 durante el proceso infeccioso (Chen *et al.*, 2009). El GLUT1 tiene 12 dominios transmembrana (TM) con un gran bucle extracelular entre TM1 y TM2 (Chen *et al.*, 2008), por el cual pueden ocurrir interacciones proteína-proteína (Huang *et al.*, 2015). Por lo tanto, se sugiere que GLUT1 puede estar involucrado con el infectoma de WSSV.

En un estudio realizado por Chen y colaboradores (2011) se encontró que tanto el VDAC como el transportador GLUT1, están estrechamente vinculados con el metabolismo energético de las células del camarón y por lo tanto, las alteraciones en su actividad pueden provocar el desarrollo de un fenotipo anormal. En camarones infectados con WSSV se ha encontrado una mayor expresión del *lvglut1* en la epidermis, músculo y pleópodos de los organismos (Huang *et al.*, 2015; Godoy-Lugo *et al.*, 2019). Estudios en el camarón blanco, así como en células tumorales, han reportado que tanto el GLUT1 como el VDCA están involucrados en el desarrollo del efecto Warburg (Mathupala *et al.*, 2009; Hernández-Palomares *et al.*, 2018; Godoy-Lugo *et al.*, 2019).

En una investigación reciente llevada a cabo por Hernández-Palomares y colaboradores (2018), se reportaron cambios por efecto de la infección con el WSSV que incluyen el aumento en la expresión y actividad de la lactato deshidrogenasa y un incremento en la concentración de glucosa y lactato en los camarones infectados. Dichos autores demostraron que el factor inducible por la hipoxia HIF-1 regula la actividad de LDH, sugiriendo que la infección por WSSV puede provocar la inducción de cierto grado de hipoxia en las células infectadas; estos resultados apoyan las investigaciones realizadas por Chen y colaboradores (2011) y Chimeo-Núñez (2017), que sugirieron que *L. vannamei* podría presentar un efecto tipo Warburg durante la infección con WSSV o bajo estrés oxidativo debido a los ciclos de hipoxia-reoxigenación.

En el estudio realizado por Chen y colaboradores (2011), se sugirió que la infección con el WSSV causa una respuesta metabólica tipo efecto Warburg a las 12 h post-infección (hpi), debido a la sobreexpresión que observaron de la hexocinasa. Un aumento en la actividad de la hexocinasa y

alteraciones en el VDAC, promueven el desarrollo del efecto Warburg; además, los mismos autores plantearon que a partir de las 24 hpi, la infección con el WSSV induce la transición de la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial en los hemocitos de los camarones infectados con el WSSV. Sin embargo, estudios recientes contradicen la hipótesis planteada por Chen y colaboradores (2011), ya que se demostró que las mitocondrias aisladas del camarón blanco *L. vannamei*, no entraron en un proceso de transición de la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial, ni por efecto de la hipoxia-reoxigenación (Rodríguez-Armenta, 2018), ni por efecto de la infección con el virus del síndrome de la mancha blanca (Reyes-Zamora, 2018). De tal manera, que resulta imperante realizar un análisis detallado de las respuestas metabólicas de esta especie, con miras a establecer si existe o no una respuesta tipo efecto Warburg tanto en células expuestas a hipoxia-reoxigenación, como en aquellas infectadas por el WSSV.

### 3. HIPÓTESIS

El camarón blanco *L. vannamei* cuando es sometido a condiciones de hipoxia-reoxigenación o a la infección con el WSSV presenta una respuesta metabólica tipo efecto Warburg; esto conlleva una disminución de glucosa y un aumento del lactato en el plasma, así como un aumento en la expresión génica del transportador *lvglut1* y una disminución del glucógeno y ATP en la glándula digestiva.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Demostrar que las respuestas metabólicas del camarón blanco sometido a condiciones de hipoxia-reoxigenación o a la infección con el WSSV, coinciden con las del efecto Warburg en vertebrados.

### 4.2. Objetivos Específicos

1. Evaluar los cambios en las concentraciones plasmáticas de glucosa y lactato en camarones *L. vannamei* sometidos a hipoxia-reoxigenación o a la infección con WSSV.
2. Cuantificar las concentraciones de glucógeno, glucosa y ATP en la glándula digestiva de *L. vannamei* sometido a condiciones de hipoxia-reoxigenación o a la infección con el WSSV.
3. Evaluar cambios en la expresión del gen *lvglut1* en organismos sometidos a hipoxia-reoxigenación o a la infección con el WSSV en la glándula digestiva del camarón blanco.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Efecto de la Infección con el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca en la Respuesta Metabólica de *Litopenaeus vannamei*

El bioensayo de infección fue llevado a cabo en este estudio tuvo lugar en el Laboratorio de Referencia, Análisis y Diagnóstico en Sanidad Acuícola del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), campus Hermosillo, de acuerdo a la metodología que se describe a continuación.

#### 5.1.1. Preparación del Inóculo del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca

El inóculo de WSSV fue preparado siguiendo el protocolo descrito por Escobedo-Bonilla y colaboradores (2005), a partir de tejido infectado de camarón de la especie *Litopenaeus vannamei*, previamente diagnosticado como positivo a la infección de acuerdo al método descrito por Mendoza-Cano y Sánchez-Paz (2013). Se pesaron 6 g de músculo abdominal de un camarón infectado naturalmente con WSSV. El tejido se homogenizó en 6 volúmenes de buffer PBS estéril (pH 7.4), utilizando una licuadora con diez pulsos de 20 s por 20 s de reposo en hielo. Posteriormente se centrifugo a 3,000 x g durante 20 min a 4 °C, el sobrenadante obtenido fue centrifugado por segunda vez a 3,000 x g durante 20 min. El precipitado se descartó y el sobrenadante fue filtrado usando una membrana de 0.22 µm (Millipore, Thermo Fisher Scientific, USA). La solución resultante del filtrado fue cuantificada en 10<sup>5</sup> copias virales/µL y se utilizó como inóculo en el ensayo de infección.

### 5.1.2. Bioensayo de Infección con el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca

Los organismos utilizados en el ensayo de infección fueron donados por la cooperativa pesquera de Cruz de Piedra, Sonora. La ausencia de copias del WSSV en los organismos se confirmó mediante PCR en tiempo real como se describe en la sección 5.1.3. Un total de 170 camarones adultos (*L. vannamei*) con un peso de  $20 \pm 1.2$  g fueron distribuidos equitativamente en 12 tanques con 110 L de agua de mar cada uno. Los organismos se aclimataron durante 8 días a condiciones de salinidad, temperatura y aireación constantes (35 ppm y 28 °C, respectivamente), y fueron alimentados con alimento comercial Camaronina 35<sup>MR</sup> (Purina, México) con raciones diarias de 3% de la biomasa total del tanque. Al concluir la aclimatación se suspendió la alimentación de los camarones y estos fueron divididos en cuatro grupos: un grupo testigo (n=50) y tres grupos infectados (cada uno con n=40). Los camarones en los grupos infectados fueron inyectados intramuscularmente en el tercer segmento dorsal con 100 µL del inóculo de WSSV; mientras que el grupo testigo fue inyectado con 100 µL de una mezcla homogénea de tejido libre de virus (previamente confirmado por PCR) en solución salina. A las 0 hpi fue muestreada únicamente la tina del grupo testigo y una vez realizada la infección se muestrearon 10 organismos de cada una de las tinas, tanto de la tina del grupo testigo como de las tinas con camarones infectados a las 6, 12, 24 y 48 hpi.

Para evaluar la carga viral de los organismos infectados y la concentración de los metabolitos secundarios (glucosa y lactato) en el plasma, durante la toma de muestras se extrajo la hemolinfa de cada organismo a partir del seno ventral utilizando una jeringa de 1 mL con 200 µL de anticoagulante frío (450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM EDTA-Na<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, pH 7.3, 850 mOsm/Kg; Vargas-Albores *et al.*, 1993). Posteriormente se procedió a la disección de la glándula digestiva para la cuantificación de glucosa, glucógeno y ATP, y la evaluación de la expresión génica del *lvglut1*. Todas las muestras colectadas fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso.

### 5.1.3. Confirmación de la Infección y Evaluación de la Carga Viral

Para confirmar la infección de los camarones y evaluar la carga viral del WSSV se realizó la separación de los hemocitos y el plasma, para lo cual la hemolinfa muestreada fue centrifugada a 600 x g durante 10 min a 4 °C. El ADN genómico de cada muestra fue aislado a partir de los hemocitos de los camarones infectados usando el kit GeneClean spin (MP biomedical, Valiant Co., CHN), según lo descrito por el fabricante. La detección del ADN viral insertado en el ADN genómico de los camarones fue realizada según el método reportado por Mendoza-Cano y Sánchez-Paz (2013) cómo se describió previamente en la sección 5.1.1. La cuantificación de la carga viral se realizó por PCR en tiempo real mediante la amplificación del gen que codifica a la proteína VP28 de la cápside viral.

Para la cuantificación absoluta del gen *vp28* se construyó una curva estándar y se evaluaron seis diluciones seriadas (1:10, v/v) de un purificado de ADN positivo del virus con una concentración inicial de 6 ng/μL y una relación 260/280 nm de 2.38, teniendo 3.94 x 10<sup>10</sup> copias del WSSV.

La eficiencia de la amplificación (E) se calculó según la fórmula:

$$E = 10^{\left[-\frac{1}{\text{pendiente}}\right]} - 1 \text{ (Bustin } et al., 2009) \text{ (1)}$$

La evaluación de la carga viral en el ADN aislado de los camarones testigo e infectados de cada tiempo muestreado fue realizada siguiendo la metodología descrita por Mendoza-Cano y Sánchez-Paz (2013), utilizando los oligonucleótidos específicos VP28-140Fw (5'-AGG-TGT-GGA-ACA-ACA-CAT-CAA-G-3') y VP28-140Rv (5'-TGC-CAA-CTT-CAT-CCT-CAT-CA-3'). Cada reacción se llevó a cabo por triplicado adicionándose en cada una: 50 ng de ADN en 1 μL de templado en una mezcla PowerUp SYBRGreen Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, USA), 10 μM de cada oligonucleótido VP28-140Fw y VP28-140Rv y 3.4 μL de agua para un volumen final de 10 μL. Las condiciones de amplificación fueron: 5 min a 95 °C, y 33 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 61 °C y 30 s a 72 °C y una extensión de 5 min a 72 °C.

## 5.2. Efecto de la Hipoxia-Reoxigenación en la Respuesta Metabólica de *Litopenaeus vannamei*

### 5.2.1. Bioensayo de Hipoxia-Reoxigenación en *Litopenaeus vannamei*

Los organismos utilizados en el ensayo de hipoxia-reoxigenación fueron donados por la cooperativa pesquera Cruz de Piedra, Sonora. Un total de 153 camarones juveniles (*L. vannamei*) con un peso de  $13.18 \pm 1.50$  g fueron distribuidos equitativamente en 4 tanques de plástico con 60 L de agua de mar cada uno. Los camarones fueron aclimatados por un periodo de 7 días en condiciones de salinidad, temperatura y aireación constantes (35 ppm y 28 °C, respectivamente). Una vez aclimatados, se suspendió la alimentación y fueron divididos en cuatro grupos: un grupo testigo (n=45) y tres grupos tratados (n=36 cada uno). Las condiciones de normoxia y reoxigenación estuvieron definidas por una concentración de oxígeno disuelto en el agua marina de 5.0 mg/L y 4.0 mg/L, respectivamente, mientras que durante la hipoxia los niveles de oxígeno se establecieron en 1.5 mg/L (NOM-001-SEMARNAT-1996).

Al inicio del experimento (tiempo cero) y en condiciones de normoxia se muestrearon 9 camarones de la tina del grupo testigo. Subsecuentemente, los grupos tratados fueron expuestos a hipoxia-reoxigenación. Las condiciones hipóxicas se establecieron en los tres tanques experimentales usando una cubierta plástica y burbujeo gradual de gas nitrógeno (99% de pureza) para desplazar al oxígeno hasta alcanzar una concentración de oxígeno constante de 1.5 mg/L. Las concentraciones de oxígeno disuelto en el agua fueron monitoreadas constantemente a lo largo del ensayo usando un oxímetro sumergible marca YSI 550A (Spena Group, Perú). Se tomaron muestras a las 6 y 12 h de hipoxia de 9 organismos de cada tina. Durante la fase de reoxigenación se retiró la cubierta plástica que cubría las tinas y se colocaron 6 piedras aireadoras en cada tanque para restablecer los niveles de oxígeno en el agua. Se tomaron muestras a las 6 y 12 h de reoxigenación de 9 organismos de cada tina. Durante la toma de muestras para la evaluación de los metabolitos secundarios (glucosa y lactato) en el plasma, se extrajo la hemolinfa usando el mismo procedimiento descrito en el ensayo de infección. Posteriormente se procedió a la disección de la glándula digestiva para la cuantificación de glucosa, glucógeno y ATP y para la evaluación de la expresión génica del *lvglut1*. Todas las muestras colectadas fueron almacenadas a  $-80$  °C hasta su uso.

### 5.3. Cuantificación de L-lactato y Glucosa en el Plasma del Camarón

Una vez obtenidas las muestras de plasma de los organismos de ambos bioensayos, se procedió a la evaluación del efecto de la infección con el WSSV o la exposición a hipoxia-reoxigenación mediante el análisis de las concentraciones de glucosa y L-lactato. La hemolinfa se centrifugó a 700 x g durante 10 min a 4 °C. El plasma se separó de los hemocitos y se utilizó para la cuantificación de lactato con el kit L-lactato PAP y de glucosa con el kit Gluc-PAP, ambos de la casa comercial Randox (Reino Unido).

La cuantificación de lactato se basa en el acoplamiento de dos reacciones. El L-lactato presente en la muestra es el sustrato de la enzima lactato-oxidasa que produce piruvato y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) a expensas de una molécula de dióxígeno ( $O_2$ ). En una segunda reacción, la peroxidasa a partir del  $H_2O_2$  producido y la 4-aminoantipirina, más N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropilo) -m-toluidina (TOOS), producen cuatro moles de agua y un producto colorimétrico de color púrpura que es detectado a 550 nm. Para la cuantificación de glucosa se mide la actividad de la enzima glucosa-oxidasa, que en presencia de agua y  $O_2$  degrada la glucosa contenida en el plasma hasta ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Este último es utilizado por la peroxidasa en presencia de 4-aminofenazona y fenol, para producir cuatro moles de agua y quinoneimina, complejo de color púrpura que se determina espectrofotométricamente a los 490 nm.

Ambas evaluaciones fueron realizadas por triplicado en un lector de microplacas (Bio-Rad, USA) siguiendo el protocolo de Sánchez-Paz y colaboradores (2007). Brevemente, en una microplaca de 96 pozos se adicionaron por triplicado 2  $\mu$ L de la solución estándar (40 mg/dL de L-lactato y 98 mg/dL de glucosa) y 10  $\mu$ L de solución anticoagulante como blanco, se agregaron además 10  $\mu$ L de cada muestra de plasma y a cada reacción se le adicionaron 200  $\mu$ L de los reactivos R2 del kit L-lactato PAP o R1b del kit Gluc-PAP, respectivamente. La microplaca se incubó a 37 °C por 5 min y se detectó la absorbancia a las longitudes de ondas correspondientes para cada metabolito.

La concentración de L-lactato o glucosa se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$Cf = \frac{Abs\ muestra - Abs\ blanco}{Abs\ estándar} * S \quad (2)$$

*Donde Abs representa la absorbancia de la muestra, el blanco y el estándar, respectivamente; Cf es la concentración final de cada metabolito y S es la concentración de la solución estándar*

#### 5.4. Cuantificación de Glucosa, Glucógeno y ATP en la Glándula Digestiva del Camarón

Para cuantificar las concentraciones de la glucosa, el glucógeno y el ATP en la glándula digestiva de los camarones de ambos bioensayos, se realizaron mezclas de 100 mg de tejido por cada tina en cada tiempo muestreado con el objetivo de contar con el tejido suficiente para realizar todas las determinaciones. En el caso de los organismos del bioensayo de infección con el WSSV se muestrearon 10 organismos de cada tina, por tanto, se tomaron 10 mg de tejido de cada muestra. En el caso de los camarones del bioensayo de hipoxia-reoxigenación se muestrearon 9 organismos de cada tina y se siguió la misma metodología, tomando 11 mg de tejido de cada muestra. Obteniéndose en total 17 mezclas de 100 mg de tejido por cada bioensayo.

Para obtener el homogeneizado de cada muestra, a cada mezcla de tejido se le adicionaron 200  $\mu$ L de agua milliQ estéril, posteriormente las muestras fueron homogeneizadas y luego centrifugadas a 16,500 x g a 4 °C por 10 min. El sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo estéril y fue utilizado para la evaluación de metabolitos en la glándula digestiva.

##### 5.4.1. Determinación de Glucosa y Glucógeno en la Glándula Digestiva de *L. vannamei*

La cuantificación de la concentración de glucosa en la glándula digestiva se realizó con el kit Gluc-

PAP de la casa comercial Randox (Reino Unido), como se describió previamente en la sección 5.3. Las evaluaciones fueron realizadas por triplicado en un lector de microplacas (Bio-Rad, USA), siguiendo el protocolo de Sánchez-Paz y colaboradores (2007), utilizando 10  $\mu$ L de cada muestra por reacción y 200  $\mu$ L del reactivo correspondiente.

La cuantificación de glucógeno almacenado en la glándula digestiva se llevó a cabo en el Laboratorio de Referencia, Análisis y Diagnóstico en Sanidad Acuícola del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), campus Hermosillo. La concentración de glucógeno se determinó cuantificando glucosa hidrolizada usando el método reportado por Van Handel (1985), en el cual los polisacáridos presentes en la muestra se degradan a dímeros o monómeros por acción del calor y el ácido sulfúrico. Estos compuestos se condensan con la antrona, generando un cromógeno cuya absorbancia se detectó a los 620 nm. Para la evaluación se construyó una curva estándar partiendo de una concentración inicial de glucosa de 5 mg/mL, a partir de la cual se realizaron seis diluciones seriadas (1:2 v/v) con ácido tricloroacético al 20 % (TCA, por sus siglas en inglés), quedando las siguientes concentraciones finales: 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.1563 y 0.0781 mg/mL (Ver Anexos). De cada solución se tomó 0.1 mL y se le adicionó 1 mL de antrona al 0.1%, la mezcla se incubó a 90 °C por 5 min y posteriormente se colocó por 1 min en agua con hielo. Posteriormente se procedió a registrar la absorbancia a 620 nm.

Para cuantificar el glucógeno presente en las muestras, 100 mg de tejido fueron homogeneizados en 200  $\mu$ L de agua miliQ estéril y posteriormente fueron adicionados 300  $\mu$ L de TCA al 20 %. Luego las muestras fueron homogenizadas por inversión manual de los tubos y se centrifugaron a 1,400 x g a 4 °C por 10 min. Se descartó el precipitado y el sobrenadante fue transferido a un tubo estéril. Posteriormente para precipitar el glucógeno, del sobrenadante se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L y se le adicionaron 2 mL de etanol absoluto. Las muestras con etanol fueron centrifugadas a 1,400 x g a 4 °C por 10 min, se descartó el sobrenadante y el exceso de etanol del precipitado fue eliminado por calentamiento (70 °C). Después el glucógeno obtenido se resuspendió en 100  $\mu$ L de agua milliQ estéril y se le añadió 1 mL de antrona al 0.1% (Sigma-Aldrich, USA). Las muestras con antrona fueron incubadas a 90 °C por 5 min y al terminar la incubación se colocaron por 1 min en agua con hielo. Las evaluaciones de cada muestra y de la curva estándar se llevaron a cabo por triplicado en un lector de microplacas Varioskan Lux (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, USA), midiéndose la absorbancia a 620 nm.

La concentración de glucógeno se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Glucógeno} = \frac{[(\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco}) - n]}{m} * FD \quad (3)$$

Donde *Abs* representa la absorbancia de la muestra y el blanco, respectivamente; *n* y *m* son el intercepto y la pendiente de la recta obtenida mediante el ajuste lineal de los datos en la curva estándar y *FD* es el factor de dilución (Ver Anexos).

#### 5.4.2. Cuantificación del ATP en la Glándula Digestiva de Camarón

Para la determinación de los niveles del ATP en la glándula digestiva de los camarones de cada tratamiento (infección e hipoxia-reoxigenación) fue necesario primero cuantificar el contenido de proteínas solubles en cada muestra. La proteína soluble de cada sobrenadante previamente obtenido se cuantificó por el método de Bradford (1976), para lo cual se construyó una curva estándar con albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés). La concentración inicial fue de 2 mg/mL de BSA y se realizaron cuatro diluciones seriadas (1:2, v/v). Las determinaciones tanto de la curva estándar, como de las muestras se realizaron por triplicado en un lector de microplacas (Bio-Rad, USA) a una absorbancia de 595 nm (Ver Anexos). En cada reacción se agregaron 5 µL de muestra, 45 µL de agua milliQ estéril y 250 µL del reactivo Bradford. Se realizaron diluciones con agua estéril para lograr en cada muestra una concentración final de 0.5 µg/µL que se utilizó como referencia para la posterior cuantificación del ATP en la glándula digestiva de los camarones.

La cuantificación de ATP se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Ecología Molecular del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS). Se utilizó el kit comercial ATP Assay kit (Calbiochem, EMD Biosciences Inc., USA), cuyo método de cuantificación se basa en la reacción de conversión de la luciferina en oxiluciferina por la enzima luciferasa en presencia de oxígeno, Mg<sup>2+</sup> y del ATP presente en las muestras. Siguiendo las instrucciones del fabricante se construyó una curva estándar partiendo de una

concentración inicial de 1 µg/mL de ATP y se realizaron cuatro diluciones seriadas (1:10 v/v) obteniendo las siguientes concentraciones finales: 1, 0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001 µg/mL (Ver Anexos). En una microplaca blanca para luminiscencia se adicionó 1 µL de cada muestra y 49 µL del buffer liberador de nucleótidos, posteriormente se incubó por 5 min con agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó 1 µL de la enzima, la mezcla de reacción se incubó por 10 min con agitación a temperatura ambiente y se registró la luminiscencia por 2.78 min. Las evaluaciones de cada muestra y de la curva estándar se llevaron a cabo por triplicado en un lector de microplacas Varioskan Lux (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, USA). Las concentraciones de las proteínas solubles y el ATP se determinaron mediante la ecuación 3 descrita previamente en la sección 5.4.1.

## 5.5. Evaluación de la Expresión Absoluta del ARNm del Transportador GLUT1 (*lvglut1*) en la Glándula Digestiva de Camarón

Para evaluar los cambios en la expresión génica del transportador de glucosa LvGLUT1 se diseñaron oligonucleótidos específicos a partir de la secuencia reportada para el *lvglut1* en *L. vannamei* (número de acceso del GenBank KJ701599). Para el diseño fueron utilizados los programas Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>; Untergasser *et al.*, 2007), OligoEvaluator (<http://www.oligoevaluator.com>; Sigma-Aldrich, USA) y FastPCR Professional versión 2008 (Primer Digital Ltd, FI).

### 5.5.1. Aislamiento, Cuantificación y Evaluación de la Integridad del ARN total

Se aisló el ARN total de la glándula digestiva de 35 organismos de cada bioensayo (n=70). La extracción del ARN total se realizó mediante el método del fenol-cloroformo descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). Se pesaron 100 mg de glándula digestiva, los cuales fueron homogenizados en 1 mL del reactivo NZYol (NZYTeach, USA), se incubó por 5 min a temperatura

ambiente, se adicionaron 0.2 mL de cloroformo y la mezcla se homogeneizó. A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 15,300 x g durante 15 min a 4 °C y se recuperó la fase acuosa de la muestra. Se realizó una segunda extracción para obtener el ARN total con un mayor grado de pureza, adicionando 0.5 mL de NZYol y repitiendo el paso de centrifugación. Se tomó la fase acuosa y se adicionó 1 mL de alcohol isopropílico frío para la precipitación el ARN total; la mezcla se incubó durante toda la noche a -20 °C y posteriormente fue centrifugada a 15,300 x g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue descartado y se adicionó 1 mL de etanol al 75% al precipitado y se centrifugó a 6,000 x g 5 min a 4 °C, para eliminar los residuos de alcohol isopropílico. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se incubó a temperatura ambiente para eliminar el exceso de etanol.

El precipitado de ARN total se re-suspendió en 20 µL de agua DEPC (dietilpirocarbonato) al 0.1% y se cuantificó por triplicado en un espectrofotómetro NanoDrop ® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA). La pureza de cada muestra se evaluó mediante el cociente de las absorbancias a 260/280 nm. Para la evaluación de la integridad del ARN total, se incubaron 2000 ng de cada muestra a 65 °C por 10 min con 4 µL de buffer carga 6X y se corrió en un gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Safe ® DNA gel stain (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) a 60 volts con buffer TAE 1X y se visualizó en un fotodocumentador de luz UV Gel Doc EZ (Bio-Rad, USA), empleando el software Image Lab <sup>TM</sup> (Bio-Rad, USA).

### **5.5.2. Eliminación del ADN Genómico, Síntesis del ADNc y Amplificación del *lvglut1***

Una vez evaluada la calidad del ARN se procedió a eliminar las posibles contaminaciones por ADN genómico (ADNg) de las muestras de ARN total, se incubaron 3000 ng de ARN total a 37 °C por 20 min con la enzima recombinante DNAsa I (Roche, USA; 1.5 U/µg de ARN) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para verificar la eliminación de ADNg se realizó un PCR con oligonucleótidos específicos para *trypsina* como testigo positivo, usando el kit comercial *Taq* PCR Master Mix Kit (QIAGEN N.V., NLD); cada reacción incluyó: 2.5 µL de colorante coral, 1 µL de cada uno de los oligonucleótidos específicos (20 µM), 12.5 µL de solución *Taq* PCR Master Mix 2x, 200 ng del ARN total tratado y agua estéril para alcanzar un volumen final de 25 µL. Las

condiciones de amplificación utilizadas fueron: 3 min a 95 °C (1 ciclo); 45 s a 94 °C, 1 min a 50 °C y 1 min a 72 °C (33 ciclos) y una extensión de 10 min a 72 °C en un termociclador DNA Engine ® Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, USA).

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó utilizando el kit comercial NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit (NZYTech, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc se usó como templado en reacciones de PCR usando el kit comercial *Taq* PCR Master Mix Kit (QIAGEN, USA) y oligonucleótidos específicos para amplificar el *lvglut1* (Tabla 1). Cada reacción incluyó: 2.5 µL de colorante coral, 1 µL de cada uno de los oligonucleótidos específicos 20 µM, 12.5 µL de solución *Taq* PCR Master Mix 2x, 350 ng del ARN total tratado y agua estéril hasta un volumen final de 25 µL. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron: 2 min a 94 °C (1 ciclo); 1 min a 55 °C (1 ciclo); 3 min a 72 °C (1 ciclo); 1 min a 94 °C (1 ciclo); 1 min a 42 °C (1 ciclo); 3 min a 72 °C (1 ciclo); 1 min a 94 °C; 30 s a 55 °C, y 1 min a 72 °C (33 ciclos) y una extensión de 10 min a 72 °C en termociclador DNA Engine ® Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, USA). Ambos productos de PCR, *tripsina* y *lvglut1*, fueron analizados en geles de agarosa al 2% teñidos con SYBR Safe ® DNA gel stain (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) como se describió previamente. El ADNc obtenido fue utilizado como templado para la cuantificación absoluta del *lvglut1* mediante PCR en tiempo real (qRT-PCR).

Tabla 1. Oligonucleótidos específicos para el gen del acarreador de glucosa *lvglut.1*

Oligonucleótido	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Amplicón
LvGLUT1F1	CATGTTGAAGAAGATATTGAAG	179 pb
LvGLUT1R1	GTTGAATAATACAGCACCG	
LvGLUT1F2	CCAGTTAGAGGATGAAGC	376 pb
LvGLUT1R2	GAGGCCATACAGGTGAAG	
LvGLUT1F3	GATATTGAAGAGATGCGAGCAG	93 pb
GLUT1R7	CATGCGCAGTGCTGATGA	

### 5.5.3. Cuantificación Absoluta del ARNm del *lvglut1* por qRT-PCR

La cuantificación absoluta del ARNm del acarreador de glucosa *lvglut1* en la glándula digestiva de camarón se realizó por qRT-PCR, usando un sistema de detección de PCR en tiempo real StepOne™ (Applied Biosystems, USA). Para determinar los cambios que inducen la exposición a hipoxia-reoxigenación o la infección con el WSSV en la expresión absoluta del gen *lvglut1* se construyó una curva estándar y se evaluaron cinco diluciones seriadas (1:2 v/v), partiendo de 250 ng/μL de ADNc. Las diluciones se prepararon con agua estéril, obteniéndose las siguientes concentraciones finales: 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 y 7.8125 ng/μL de ADNc, respectivamente (Ver Anexos).

Para la amplificación de *lvglut1* se utilizaron los oligonucleótidos específicos LvGLUT1F3 y GLUT1R7 que corresponden a un amplicón de 93 pb (Tabla 1). Para la curva estándar, cada reacción de PCR consistió en 10 μL de mezcla iQ SYBR® Green Supermix 2X (Bio-Rad, USA), 1 μL de cada uno de los oligonucleótidos específicos (5 μM), 1.48 μL de cada dilución y agua estéril hasta un volumen final de 20 μL. Cada dilución se evaluó por triplicado para construir la curva estándar. La eficiencia de la amplificación se calculó según la fórmula descrita en la sección 5.1.3.

Posteriormente se evaluaron las 31 muestras de cada bioensayo, la cuantificación se realizó por triplicado y cada reacción consistió en 5 μL de mezcla iQ SYBR® Green Supermix 2X (Bio-Rad, USA), 1 μL de cada uno de los oligonucleótidos específicos antes mencionados (5 μM), 250 ng de ADNc (equivalentes a 250 ng de ARN total) y agua estéril hasta un volumen final de 10 μL. En cada corrida de qRT-PCR se incluyeron testigos negativos sin templado. Las condiciones de amplificación para las diluciones y las muestras fueron las siguientes: 5 min a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 1 min a 56 °C, posteriormente 35 s a 72 °C y un programa final de evaluación de la curva de disociación de 15 s a 95 °C y 1 min a 56 °C, aumentando la temperatura en 0.3 °C hasta 95 °C, para finalizar el programa con 15 s a 95 °C. La detección de la fluorescencia a los 522 nm se tomó en la temperatura de alineamiento de cada ciclo. La concentración inicial de transcritos del *lvglut1* se determinó mediante la ecuación 3 descrita previamente en la sección 5.4.1.

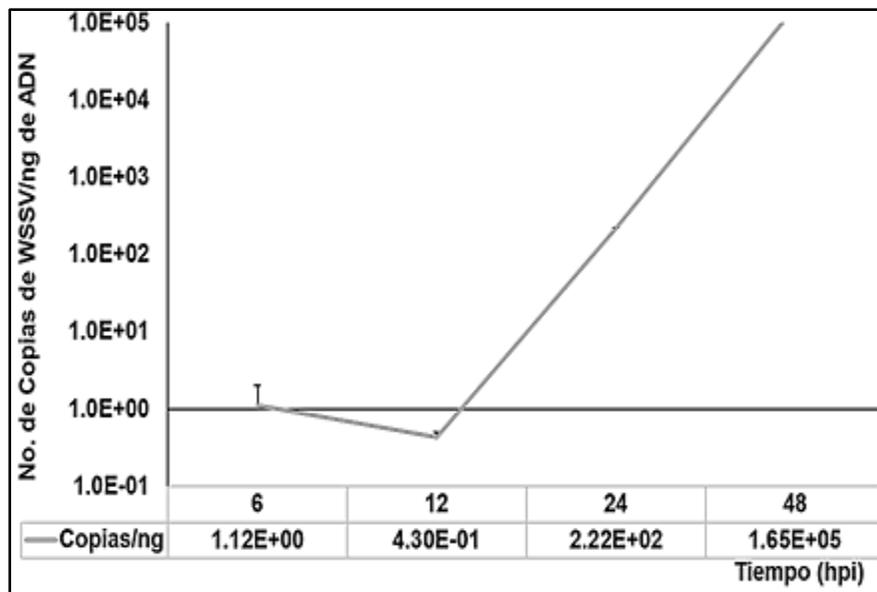
## 5.6. Análisis Estadístico

La normalidad de los datos obtenidos fue analizada por la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas se determinó con la prueba de Levene. Posteriormente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para identificar por separado las diferencias entre los tratamientos de cada bioensayo. Para determinar las diferencias estadísticas entre las medias se realizó la prueba de comparación de rangos múltiples de Fisher (LSD) con el programa estadístico NCSS 2007 (NCSS LLC., USA), considerando un intervalo de confianza del 95% ( $p < 0.05$ ).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Cuantificación de la Carga Viral en Hemocitos de los Camarones Infectados con el WSSV

La cuantificación absoluta del número de copias del gen *vp28* que codifica para la cápside viral del WSSV, confirmó la presencia del virus en todos los organismos de los grupos infectados, así como la ausencia de las partículas virales en los organismos del grupo testigo. El análisis de la cinética de la infección mostró que a las 12 hpi se presentó el menor número de copias del virus, pasado este tiempo la carga viral aumentó exponencialmente (Figura 5). Este resultado coincide con lo reportado con anterioridad en la misma especie expuesta al WSSV, donde a las 12 hpi se presentan bajos valores de carga viral, ocurriendo a continuación un aumento progresivo de las copias del virus (Chen *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2014). Este comportamiento de la carga viral en hemocitos corresponde también con los resultados de De la Re Vega (2011) sobre la expresión del gen de la ADN polimerasa del WSSV durante la infección en *L. vannamei*, quién reportó que la replicación del ADN viral inicia a las 12 hpi.



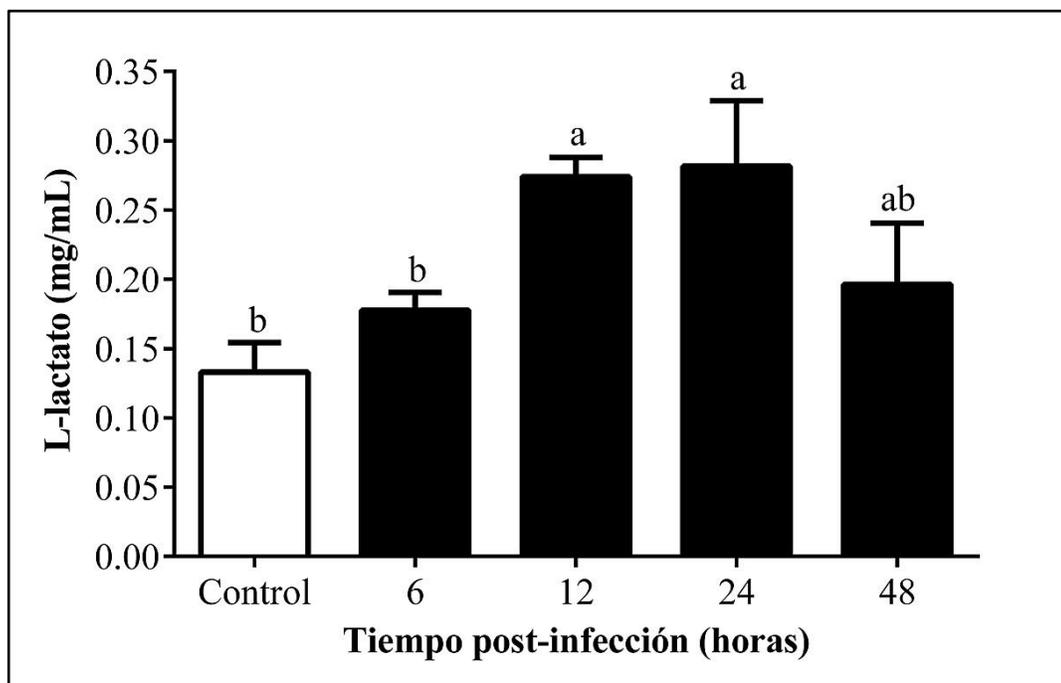
**Figura 5.** Cuantificación de la carga viral en hemocitos de camarones adultos *L. vannamei* durante el transcurso de la infección con el WSSV.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que durante las primeras 6 h de infección se lleva a cabo el ingreso del virus en las células del tejido blanco (Hernández-Pérez, 2012). Posteriormente entre las 6 y 12 hpi se expresan los genes tempranos del virus incluyendo al gen de la ADN polimerasa viral (Lan *et al.*, 2006). A las 12 hpi se lleva a cabo la replicación del material genético viral, una vez que los transcritos de los genes tempranos se han traducido, inicia la expresión de genes tardíos como *vp28*. Los genes tardíos codifican para las proteínas de la cápside y permiten el ensamblaje de los nuevos viriones del WSSV (De-la-Re-Vega, 2011). A medida que aumenta la carga viral en los organismos, incrementa el número de células infectadas, permitiendo que se repliquen nuevas copias del virus y lo anterior resulta en el aumento exponencial de la carga viral que en el presente estudio se observó a partir de las 12 hpi (Figura 5).

## 6.2. Cuantificación de L-lactato y Glucosa en el Plasma de Camarones Infectados con el WSSV

La cuantificación de L-lactato y glucosa en el plasma de los camarones infectados con el WSSV mostró cambios significativos ( $p < 0.05$ ) para ambos metabolitos (Figuras 6 y 7, respectivamente). En la evaluación de los niveles de L-lactato, se observó que en los organismos infectados las concentraciones aumentaron a las 12 y 24 hpi con respecto a los del grupo testigo ( $p < 0.05$ ); siendo estos niveles los más altos, duplicando su valor promedio con respecto al control (Figura 6). En los organismos sanos se encontró una concentración media de L-lactato de 0.13 mg/mL, valor que se encuentra dentro del rango reportado para *L. vannamei* (Rosas *et al.*, 2002).

Los resultados del presente estudio coinciden con los reportados por Chen y colaboradores (2011), dichos autores encontraron que, en los camarones infectados con el WSSV, los valores más altos de L-lactato se presentaron a las 12 hpi y los más bajos a las 48 hpi. El aumento del lactato a las 12 y 24 hpi observado en este trabajo (Figura 5), puede deberse al efecto del estrés que provoca la replicación viral en la célula; mientras que la disminución de los niveles de lactato a las 48 hpi podría ser el resultado del deterioro celular en este tiempo de infección avanzada.

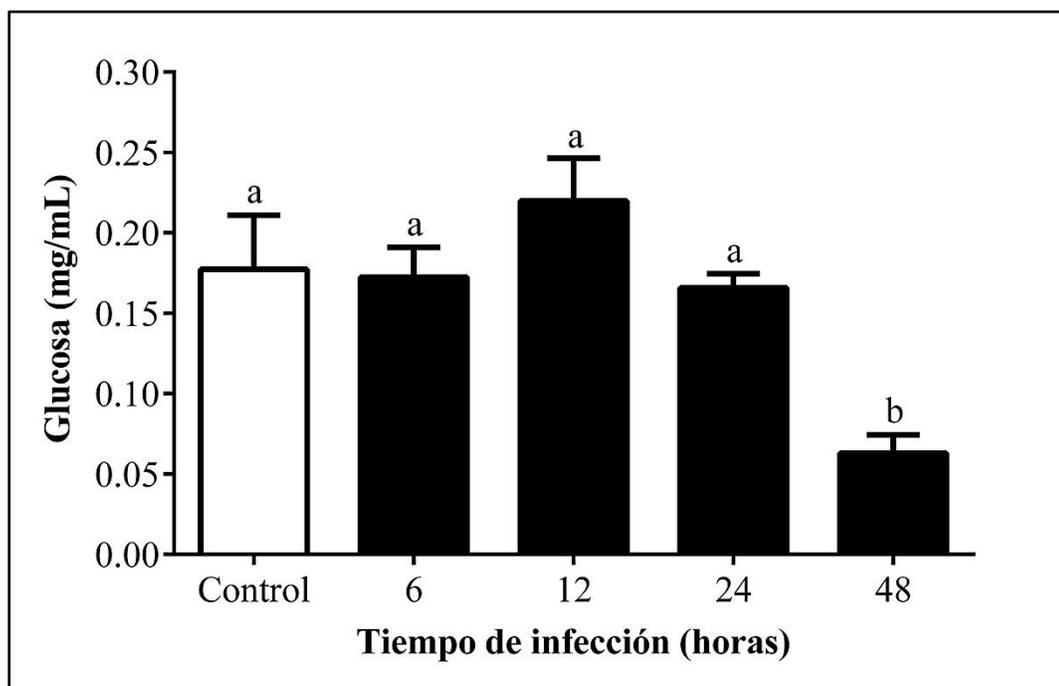


**Figura 6.** Concentración de L-lactato en el plasma de camarones adultos *L. vannamei* infectados con el WSSV. ANOVA de una vía y prueba de comparación de rangos múltiples de Fisher (LSD). Las barras representan las medias  $\pm$  EE. La barra Control agrupa los valores obtenidos para el grupo testigo a las 0, 6, 12, 24 y 48 hpi. Las barras 6, 12, 24 y 48 agrupan los valores observados para las tres tinas de organismos infectados con el WSSV en cada tiempo muestreado. Literales diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

En otro estudio previo de *L. vannamei* infectado con la bacteria *Vibrio alginolyticus*, se observó a las 48 hpi que los niveles de L-lactato presentaron un comportamiento similar, en donde las concentraciones de los organismos infectados fueron superiores a las encontradas en los organismos sanos, observándose los valores máximos a las 24 hpi (Hsieh *et al.*, 2008). Los resultados sugieren que el incremento del L-lactato ante la presencia de un patógeno no es patógeno-específico, sino que se presenta tanto en camarones infectados, como bajo condiciones de estrés y cuando el sistema inmune se activa, independientemente del patógeno que lo infecta.

Se sabe que, en los crustáceos el aumento en plasma del L-lactato es una señal que promueve la liberación de la hormona hiperglucémica de los crustáceos (CHH, por sus siglas en inglés). Bajo condiciones de estrés, el incremento de los niveles plasmáticos de la CHH induce un aumento de la producción de L-lactato en la glándula digestiva y el músculo (Stentiford *et al.*, 2001). La liberación de dicha hormona ocurre en respuesta al estrés inducido por factores como la emersión,

la inanición, la exposición a endotoxinas, el parasitismo por dinoflagelados, la contaminación con metales pesados o las altas temperaturas, y por tanto no es una respuesta patógeno-específica sino una adaptación que modula el comportamiento fisiológico de los camarones ante condiciones de estrés en general (Stentiford *et al.*, 2001; Webster *et al.*, 2012). En el presente estudio se observaron incrementos en los niveles plasmáticos de L-lactato, aún en presencia de concentraciones normales de oxígeno en el ambiente, esto concuerda con lo reportado en la literatura como una de las respuestas celulares que forman parte del efecto Warburg y ante una condición de estrés (Rosas *et al.*, 2002; Medina-Félix *et al.*, 2014).



**Figura 7.** Concentración de glucosa en el plasma de camarones adultos *L. vannamei* infectados con el WSSV. ANOVA de una vía y prueba comparación de rangos múltiples de Fisher (LSD). Las barras representan las medias  $\pm$  EE. La barra Control agrupa los valores obtenidos para el grupo testigo a las 0, 6, 12, 24 y 48 hpi. Las barras 6, 12, 24 y 48 agrupan los valores observados para las tres tinajas de organismos infectados con el WSSV en cada tiempo muestreado. Diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

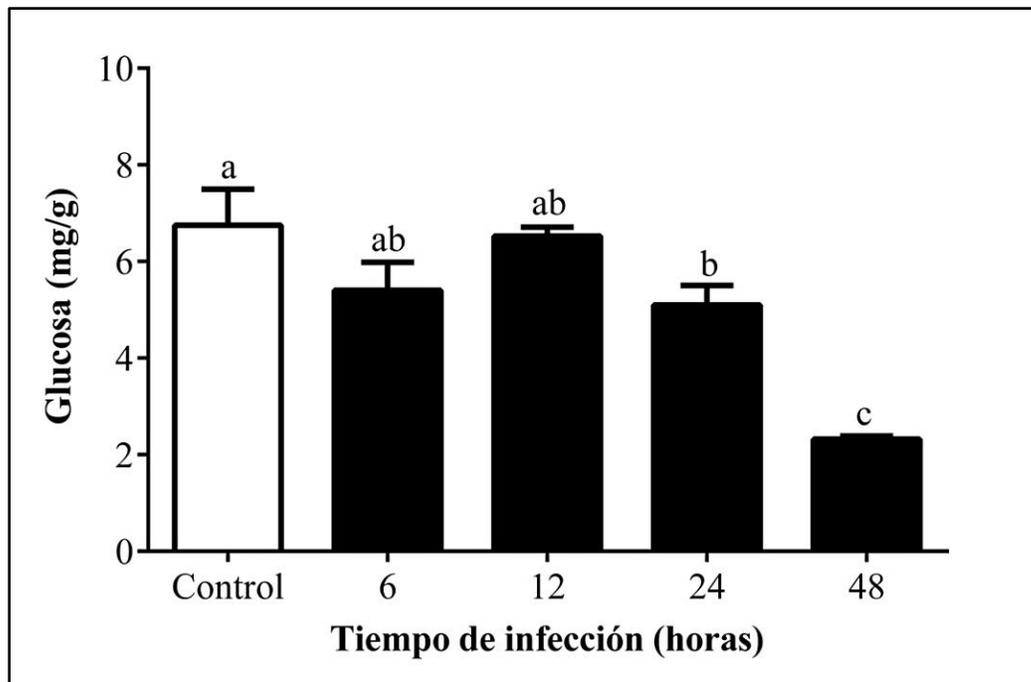
Respecto a la cuantificación de glucosa plasmática, los resultados mostraron que en los organismos sanos la concentración media de glucosa en plasma fue de 0.18 mg/mL. Este resultado coincide con lo reportado por Rosas y colaboradores (2002) para *L. vannamei*, cuyo valor de referencia para

glucosa en plasma es de  $0.33 \pm 0.2$  mg/mL (Figura 7). Durante el transcurso de la infección con el WSSV, la concentración de glucosa plasmática se mantuvo constante en los tiempos muestreados respecto a los organismos sanos, excepto a las 48 hpi donde disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ). La glucosa plasmática de los organismos infectados después de 48 hpi disminuyó 2.8 veces con respecto a los organismos sanos, presumiblemente debido a que los camarones se encontraban en una etapa muy avanzada de la infección (Figura 7).

Los resultados de glucosa plasmática obtenidos en el presente trabajo coinciden con los reportados previamente por Chen y colaboradores (2011) en *L. vannamei* infectado con el WSSV. En el citado estudio, se reporta una disminución drástica a las 36 hpi, mientras que en el presente estudio la caída significativa se registró a las 48 hpi. Los resultados del presente trabajo también coinciden con los hallazgos de Wang y colaboradores (2017) en camarones infectados con el WSSV, quienes observaron una disminución significativa en los valores de glucosa con respecto a los del grupo testigo a las 48 hpi, reportando un aumento significativo de este metabolito a las 12 y 24 hpi. Es importante destacar que las diferencias en los tiempos de respuesta pueden ser producto de la carga viral con la que se inocula al organismo. En el estudio de Wang y colaboradores (2017) se inoculó con una menor carga viral que la utilizada en el presente trabajo, por tanto los camarones infectados muestran diferentes tiempos de respuesta y un efecto menor en las variables observadas. La inoculación con una carga viral menor propiciará una menor demanda energética y una mayor disponibilidad de glucosa en el plasma durante la infección, lo cual podría explicar el aumento de la glucosa en plasma que observan dichos autores a las 12 y 24 hpi (Wang *et al.*, 2017).

El comportamiento observado en las concentraciones de glucosa plasmática corresponde con lo esperado para una respuesta tipo Warburg en los camarones infectados, debido a que esta respuesta metabólica se caracteriza por un aumento del L-lactato y un mayor consumo de glucosa. Los hidratos de carbono, en especial la glucosa, son la primera fuente de energía que los organismos utilizan ante el aumento de la demanda energética provocada por cambios ambientales como hipoxia, inanición o una infección por patógenos (Ulaje-Fernández, 2015). Por tanto, la magnitud de la disminución o el aumento de este metabolito a nivel plasmático, está directamente relacionada con la demanda energética a nivel celular. Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que la demanda de energía en los tejidos infectados puede ser sustituida con las reservas energéticas presentes en los camarones. Sin embargo, para que los organismos puedan suplir la demanda de glucosa que generan los tejidos infectados, es necesario que ocurra la degradación de las reservas

de glucosa en forma de glucógeno, almacenado principalmente en la glándula digestiva (Stentiford *et al.*, 2001; Ulaje-Fernández, 2015). Asimismo, es de esperar que ocurran cambios en los niveles de glucosa y glucógeno a nivel de la glándula digestiva y un aumento en la expresión del *lyglut1* que permita transportar la glucosa del órgano hacia la hemolinfa para ser utilizada por los otros tejidos (Martínez-Quintana *et al.*, 2015).



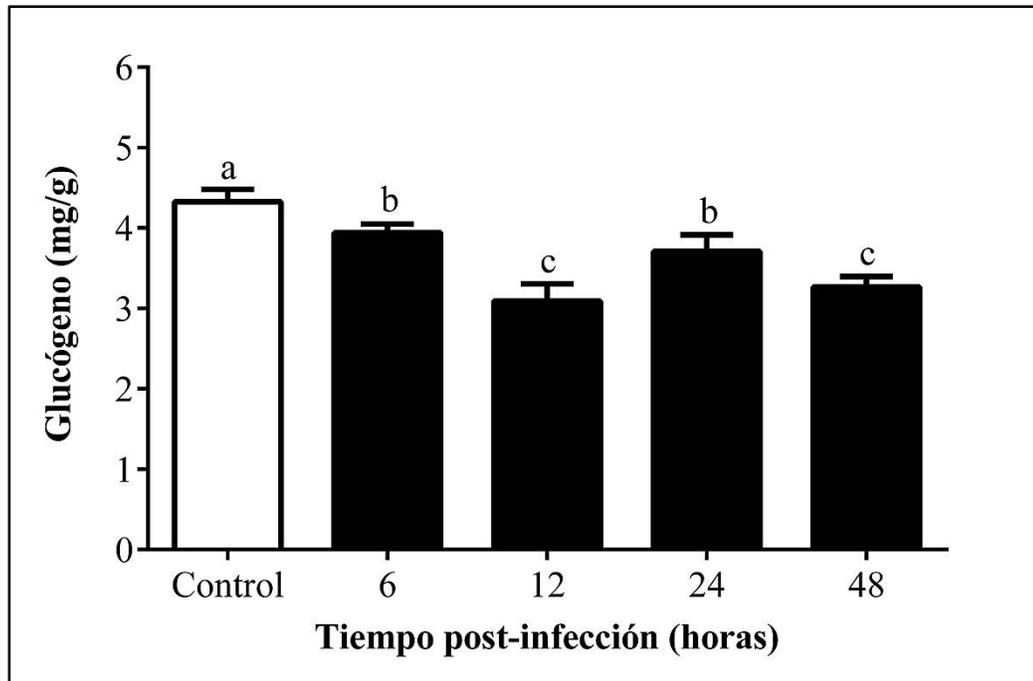
**Figura 8.** Concentración de glucosa en la glándula digestiva de camarones adultos *L. vannamei* infectados con el WSSV. ANOVA de una vía y prueba de comparación de rangos múltiples de Fisher (LSD). Las barras representan las medias  $\pm$  EE. La barra Control agrupa los valores obtenidos para el grupo testigo a las 0, 6, 12, 24 y 48 hpi. Las barras 6, 12, 24 y 48 agrupan los valores observados para las tres tinajas de organismos infectados con el WSSV en cada tiempo muestreado. Diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

### 6.3. Cuantificación de Glucosa, Glucógeno y ATP en la Glándula Digestiva de Camarones Infectados con el WSSV

A diferencia del contenido de glucosa plasmática, la concentración de este metabolito en la glándula digestiva de los organismos sanos presentó valores más altos, con una media de 6.75

mg/g, misma que se encuentra dentro del rango reportado por Puente-Carreón (2009) para *L. vannamei* (4.9 – 14.7 mg/g).

En el presente estudio, durante las primeras 12 hpi las concentraciones de este metabolito se mantuvieron constantes, mientras que a las 24 y 48 hpi ocurrió una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de 1.3 y 2.9 veces, con respecto a los organismos del grupo testigo (Figura 8). En 2018, Hernández-Palomares y colaboradores reportaron que en etapas avanzadas de la infección con el WSSV la glucosa en la glándula digestiva aumenta significativamente con respecto a los organismos sanos, comportamiento que no coincide con los resultados encontrados en el presente estudio, donde se observó una disminución en la concentración de glucosa en la glándula digestiva a las 24 y 48 hpi. La disminución de la glucosa en la glándula digestiva observada en el presente trabajo a las 24 y 48 hpi puede deberse al aumento de la demanda energética causada por el avance de la infección. En las Figuras 5 y 7 se puede observar que a partir de las 12 hpi ocurre un aumento exponencial de la carga viral y una disminución de la glucosa en plasma a las 48 hpi. Los resultados antes mencionados sugieren que la demanda energética de otros tejidos u órganos del camarón durante las 24 y 48 hpi supera la capacidad del organismo para suplir glucosa, como consecuencia se observa una disminución de la glucosa en el plasma y la glándula digestiva de los camarones infectados.



**Figura 9.** Concentración del glucógeno en la glándula digestiva de camarones adultos *L. vannamei* infectados con el WSSV. ANOVA de una vía y prueba comparación de rangos múltiples de Fisher (LSD). Las barras representan las medias  $\pm$  EE. La barra Control agrupa los valores obtenidos para el grupo testigo a las 0, 6, 12, 24 y 48 hpi. Las barras 6, 12, 24 y 48 agrupan los valores observados para las tres tinas de organismos infectados con el WSSV en cada tiempo muestreado. Diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

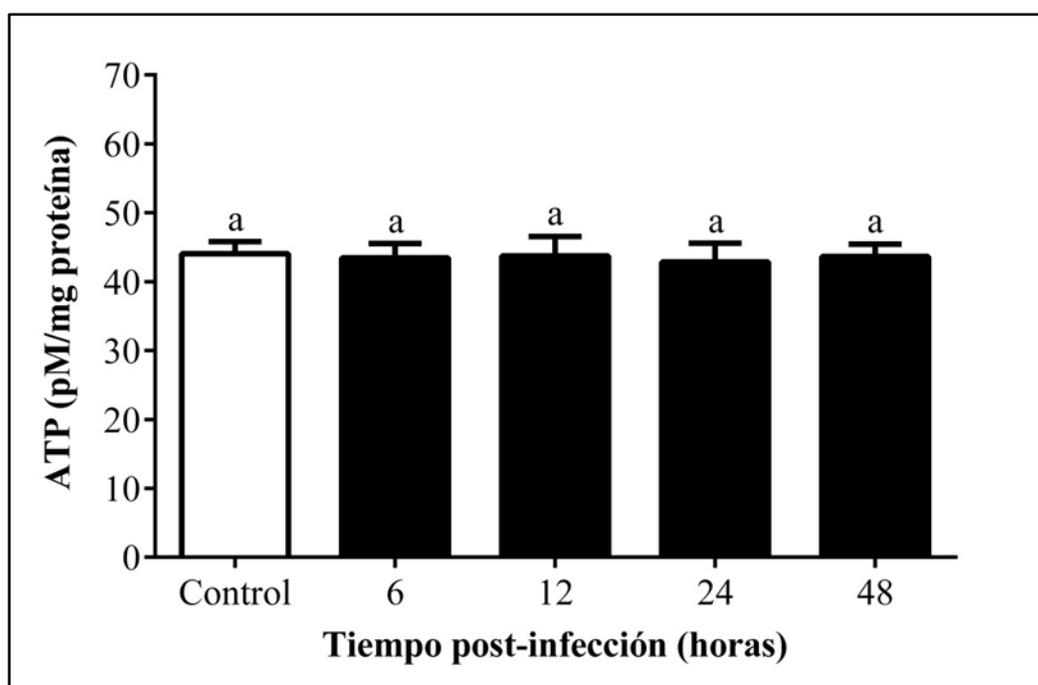
La evaluación de la concentración del glucógeno en la glándula digestiva de los organismos infectados con el WSSV mostró que hay una degradación ( $p < 0.05$ ) de este metabolito en los camarones expuestos al virus con respecto a los del grupo testigo (Figura 9). Los organismos sanos presentaron una concentración media de glucógeno en la glándula digestiva de 4.33 mg/g, dato que se encuentra dentro del rango reportado por Rosas y colaboradores (2002) en *L. vannamei*. Por otra parte, los organismos expuestos al virus presentaron valores bajos de glucógeno a las 12 y 48 hpi, con una disminución de 1.4 y 1.2 veces con respecto a los organismos sanos (Figura 9). Lo anterior, sugiere que ocurre una degradación de este metabolito como respuesta a la infección por el WSSV. Este comportamiento del glucógeno ha sido descrito como una respuesta fisiológica de los organismos ante una condición de estrés. Previamente en este trabajo, se describió que bajo la infección viral ocurre un aumento del L-lactato en plasma, activándose la síntesis y degradación de la hormona CHH, la cual a su vez promueve la degradación del glucógeno almacenado en la glándula digestiva para suplir el aumento de la demanda energética causada por la infección con el

WSSV (Stentiford *et al.*, 2001; Webster *et al.*, 2012; Ulaje-Fernández, 2015). La disminución del glucógeno a las 12 y 48 hpi se puede relacionar con el aumento de la replicación viral observada después de las 12 hpi, por lo que se sugiere que en la glándula digestiva, que es un órgano de reserva, el glucógeno se hidroliza a glucosa para suplir las demandas energéticas de la célula durante el proceso de infección (Stentiford *et al.*, 2001).

Por otra parte, en un estudio reciente realizado por Hernández-Palomares y colaboradores (2018) se demostró que durante las etapas avanzadas de la infección con el WSSV, en la glándula digestiva de *L. vannamei* se produce una sobreexpresión de los transcritos de la LDHvan-2, una isoforma de la lactato deshidrogenasa LDHvan que presenta la capacidad de convertir el L-lactato en piruvato, favoreciendo la producción de glucosa por gluconeogénesis y la formación de glucógeno, en dependencia de la demanda energética de los tejidos, lo cual explicaría la reducción de lactato a las 24 y 48 hpi y la movilización de reservas en la glándula digestiva (García *et al.*, 1994; Zamora-Méndez, 2017). La hidrólisis del glucógeno como respuesta a un proceso infeccioso ha sido reportado en otros crustáceos como la langosta noruega (*Palinurus elephas*) infectada con el parásito *Hematodinium* sp., y *Panulirus argus* infectada con el Panulirus-argus-virus-1 (PaV1) (Stentiford *et al.*, 2001; Herrera-Salvatierra *et al.*, 2019). Este comportamiento coincide con la respuesta tipo Warburg de los vertebrados, la cual se caracteriza por un aumento en el consumo de glucosa a expensas de las reservas de glucógeno (Warburg, 1956; Hernández-Díaz y Herrera-Burgos, 2002).

Los resultados encontrados en el presente estudio tanto para la glucosa en el plasma, como para el glucógeno y la glucosa en la glándula digestiva, sugieren que durante la infección con el WSSV, los camarones pueden sintetizar glucosa *de novo* durante la gluconeogénesis haciendo uso de otras fuentes de energía como el glicerol, lactato, piruvato, lípidos o aminoácidos como la glutamina, como se observa en los vertebrados (García *et al.*, 1994; Astrofsky *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2014; Reyes-Ramos *et al.*, 2018). En un estudio realizado por Su y colaboradores (2014) donde se evaluaron los cambios en el metaboloma de *L. vannamei* ante la infección con el WSSV, se reportó un incremento de la glutaminólisis en los camarones. Se sabe que el uso de la glutamina como fuente de carbono o ATP ha sido ampliamente reportado en células tumorales y es una de las características del efecto Warburg (Kovačević y Morris, 1972; Hensley, *et al.*, 2013; Altman *et al.*, 2016); por lo tanto, el aumento de la glutaminólisis reportado en los camarones infectados, reforzaría la hipótesis del posible desarrollo de una respuesta tipo Warburg en estos organismos.

Por otra parte, los resultados de la cuantificación del ATP en la glándula digestiva de los organismos infectados no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) respecto a los animales del grupo testigo, ni entre los tiempos de infección, presentando una concentración promedio de ATP de 43.24 pM/mg de proteína (Figura 10). Como se mencionó anteriormente en este trabajo, los camarones infectados presentaron niveles altos de L-lactato respecto los controles, lo cual sugiere que a nivel celular hubo un cambio hacia el metabolismo anaerobio. Bajo estas condiciones la obtención de energía es menos eficiente, debido a que sólo se obtienen 2 moléculas de ATP por molécula de glucosa degradada, en comparación con las 36 moléculas de ATP que se obtienen mediante la fosforilación oxidativa en el metabolismo aerobio (Alberts *et al.*, 2010). Basado en lo anterior, se esperaría una disminución de la concentración de ATP en la glándula digestiva de los organismos infectados; sin embargo, hay evidencias que reportan el uso de fuentes de energía alternas a la glucólisis bajo condiciones aerobias o anaerobias en los camarones, como la degradación de los fosfágenos o una mayor utilización de la glutamina como fuente de carbono, para la obtención rápida de energía en forma de ATP y hacer frente a la infección viral (Su *et al.*, 2014; Rao *et al.*, 2016; Reyes-Ramos *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019).



**Figura 10.** Concentración de ATP en la glándula digestiva de camarones adultos *L. vannamei* infectados con el WSSV. ANOVA de una vía y prueba de comparación de rangos múltiples de Fisher (LSD). Las barras representan las medias  $\pm$  EE. La barra Control agrupa los valores

obtenidos para el grupo testigo a las 0, 6, 12, 24 y 48 hpi. Las barras 6, 12, 24 y 48 agrupan los valores observados para las tres tinas de organismos infectados con el WSSV en cada tiempo muestreado. Diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

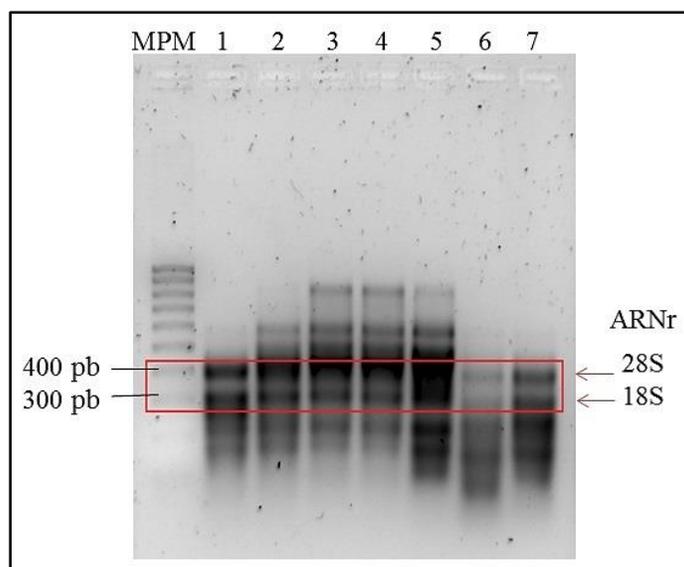
Se sabe que, en los crustáceos la arginina-fosfato es el fosfágeno presente y su síntesis y degradación está mediada por la enzima arginina cinasa (García-Orozco *et al.*, 2007). Esta enzima cataliza la transferencia reversible de un grupo fosforil del  $Mg^{2+}ATP$  a la arginina, para formar arginina-fosfato y  $Mg^{2+}ADP$  (Pan *et al.*, 2004). Los fosfágenos funcionan como un reservorio de energía que puede ser rápidamente utilizado, debido a que los fosfatos almacenados en forma de arginina-fosfato pueden transferirse rápidamente al ADP cuando existe una demanda repentina de ATP a nivel celular (López-Zavala *et al.*, 2013).

En los camarones infectados con el WSSV se ha observado que la transcripción de la arginina cinasa está regulada negativamente durante las primeras etapas de la infección, mientras que en las más avanzadas hay una sobreexpresión de los transcritos de esta enzima en la glándula digestiva (Astrofsky *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006). Un aumento en los niveles de expresión de esta enzima en condiciones de alta demanda energética indica una degradación de los fosfágenos para suplir los requerimientos energéticos de la célula. Lo anterior sugiere que, mediante esta ruta las células de los camarones infectados podrían mantener estables los niveles de ATP como un mecanismo de rescate energético, explicando las concentraciones estables de ATP que se observaron en este estudio. Por otra parte, Wang y colaboradores (2019) reportaron el aumento del uso de la glutamina durante la etapa replicativa de la infección con el WSSV (12 hpi) en *L. vannamei*, sugiriendo el desarrollo de una respuesta tipo efecto Warburg. Sin embargo, la ausencia de cambios en los niveles de ATP observados en este estudio no coincide con la tendencia previamente descrita para el efecto tipo Warburg en vertebrados, en donde se ha detectado una disminución en los niveles de ATP o un aumento en el radio ADP/ATP (Schwartz *et al.*, 2017).

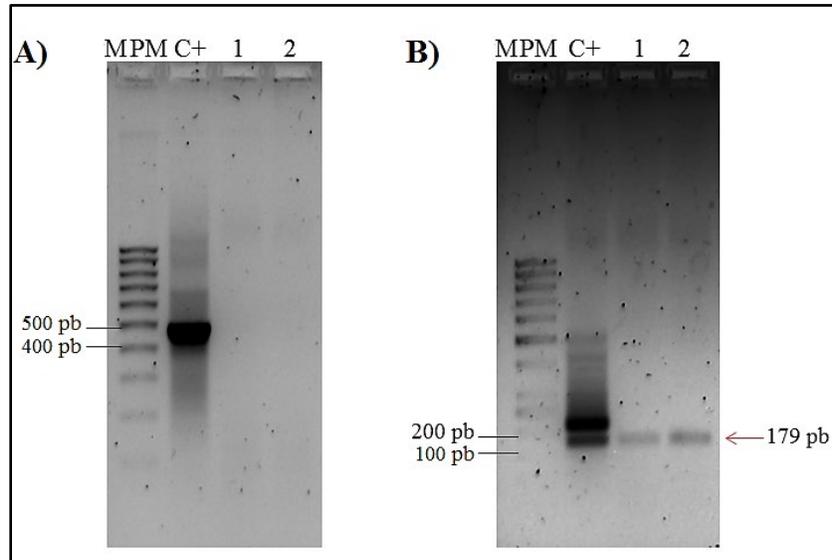
Aunque el comportamiento del ATP en la glándula digestiva de *L. vannamei* no coincide con lo mayormente descrito en la literatura, no es posible descartar la ocurrencia de una respuesta tipo Warburg en los camarones expuestos al WSSV, en donde una baja en los niveles de ATP pudiera activar el uso de la glutamina y de los fosfágenos como fuentes alternas para la obtención de energía en los camarones infectados con el WSSV, ambas respuestas le permitirían al camarón hacer frente a la infección sin agotar sus reservas energéticas (Astrofsky *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2014).

#### 6.4. Evaluación de la Expresión Absoluta del ARNm del Transportador GLUT1 (*lvglut1*) en la Glándula Digestiva de Camarones Infectados con el WSSV

Una de las principales características del efecto Warburg reportada en células tumorales, es la sobreexpresión de los transportadores de glucosa de alta afinidad, GLUT1 y GLUT3 (De Alteriis *et al.*, 2018). En el presente estudio se cuantificó la expresión absoluta del transcrito *lvglut1* en la glándula digestiva de camarones expuestos al WSSV y en camarones sanos. Primero, se confirmó la integridad del ARN total de la glándula digestiva de los organismos sanos e infectados identificándose las bandas que corresponden a las subunidades 28S y 18S del ARN ribosomal (Figura 11).

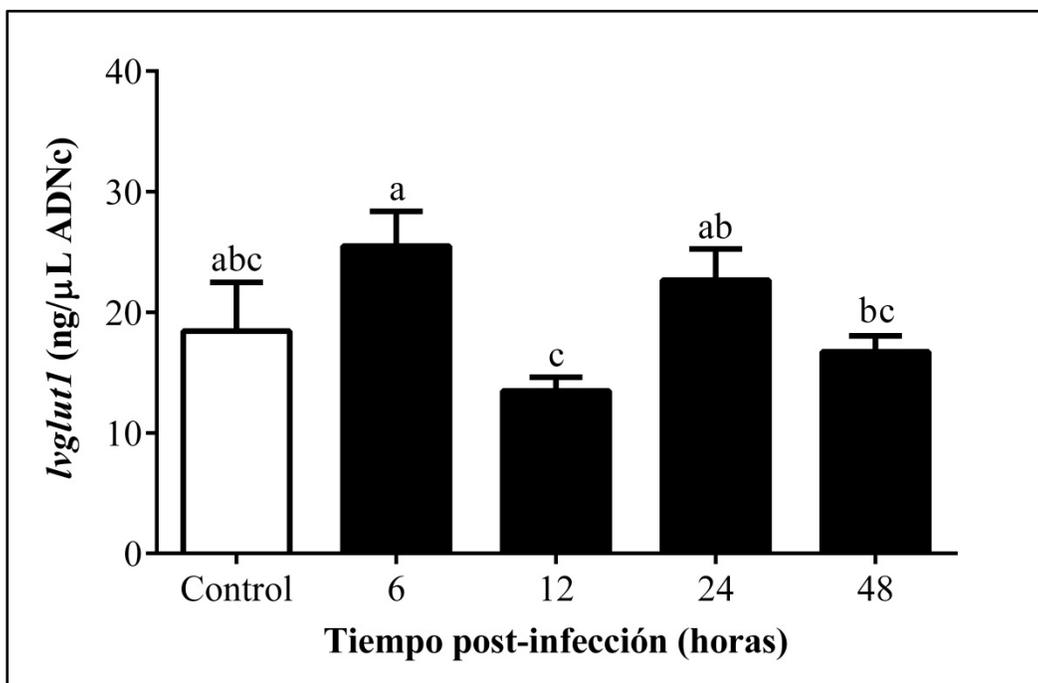


**Figura 11.** Integridad del ARN total aislado de la glándula digestiva de camarones adultos *L. vannamei* infectados con el WSSV. MPM: marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA). Carriles 1-5: ARN total aislado de muestras de los animales del grupo testigo. Carriles 6-7: ARN total aislado de organismos infectados.



**Figura 12.** **A)** Eliminación del ADNg en el ARN total aislado de la glándula digestiva de camarones adultos *L. vannamei* infectados con el WSSV. MPM: marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA). C+: ADNg aislado de la glándula digestiva de *L. vannamei*. Carriles 1-2: ARN total aislado de muestras de los animales del grupo testigo. **B)** Comprobación de la síntesis del ADNc. MPM: marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA). C+: ADNc obtenido de ARN total de la glándula digestiva de *L. vannamei*. Carriles 1-2: ADNc de muestras de los animales del grupo testigo.

Posteriormente se realizó la eliminación del ADN genómico (ADNg) y la ausencia del mismo se comprobó mediante la amplificación del gen que codifica a la tripsina del camarón como testigo positivo en las muestras de ARN total. La ausencia de bandas corroboró que el ARN total estaba libre de contaminación con ADNg (Figura 12A) y se realizó la síntesis del ADNc, mismo que fue usado como templado para la amplificación por PCR de un fragmento de 179 pb (Tabla1; Figura 12B).



**Figura 13.** Expresión del acarreador de glucosa *lvglut1* en la glándula digestiva de camarones adultos *L. vannamei* infectados con el WSSV. ANOVA de una vía y prueba de comparación de rangos múltiples de Fisher (LSD). Las barras representan las medias  $\pm$  EE. La barra Control agrupa los valores obtenidos con 250 ng de ADNc para el grupo testigo a las 0, 6, 12, 24 y 48 hpi. Las barras 6, 12, 24 y 48 agrupan los valores observados 250 ng de ADNc para las tres tinas de organismos infectados con el WSSV en cada tiempo muestreado. Diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

El análisis de la expresión absoluta mediante qRT-PCR del *lvglut1* en la glándula digestiva de camarones infectados mostró que los organismos expuestos al WSSV no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) con respecto al de los animales del grupo testigo. Sin embargo, si se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos de las 6 y 12 hpi y entre las 12 y las 24 hpi ( $p < 0.05$ ; Figura 13). Los organismos infectados después de 6 hpi presentaron mayor concentración de transcritos del *lvglut1*, con un valor aproximado de 25.48 ng/μL equivalentes de ARNm. Se observó que a las 12 hpi ocurrió una disminución de los transcritos de aproximadamente 1.9 veces con respecto a 6 hpi, seguido de una recuperación en los niveles de transcritos de *lvglut1*. En 2019, Godoy-Lugo y colaboradores reportaron que cuando *L. vannamei* es infectado con el WSSV, la expresión del *lvglut1* es estimulada de manera tejido-específica. Dichos autores encontraron que a las 24 y 48 hpi la infección induce una mayor expresión del *lvglut1* en el músculo que en la glándula digestiva. Lo anterior pudiera explicar porque no se encontraron diferencias

significativas en la expresión del *lvglut1* entre el grupo control y los grupos infectados en el presente trabajo. Los cambios observados en la concentración de los transcritos del transportador en el presente estudio podrían relacionarse con la magnitud de la demanda energética en cada tiempo post-infección. El aumento de los transcritos a las 6 hpi podría ser causado por el aumento de la demanda energética en los tejidos infectados para contrarrestar los efectos de la infección y también debido a la expresión de los genes tempranos del WSSV como reportó De-la-Re-Vega, (2011); posteriormente a las 12 hpi, el número de transcritos del *lvglut1* disminuyó, pues en este punto se está llevando a cabo la replicación del material genético del virus y hay una baja carga viral, aumentando nuevamente la expresión del *lvglut1* con el incremento del número de copias virales y con el incremento de la demanda energética causada por el avance de la infección (Astrofsky *et al.*, 2002).

Asimismo, al aumentar la carga viral a las 24 y 48 hpi, también se observó una disminución de la glucosa y el glucógeno en la glándula digestiva en ambos tiempos, mientras que sólo se observó un decremento de la glucosa plasmática a las 48 hpi. Estos resultados en conjunto sugieren que, en la glándula digestiva el transportador GLUT1 promueve la exportación de la glucosa hacia la hemolinfa, puesto que en los camarones dicho órgano metaboliza y almacena los nutrientes ingeridos en la dieta y por tanto la glucosa es transportada hacia la hemolinfa donde existe una menor concentración de este metabolito (Martínez-Quintana *et al.*, 2016).

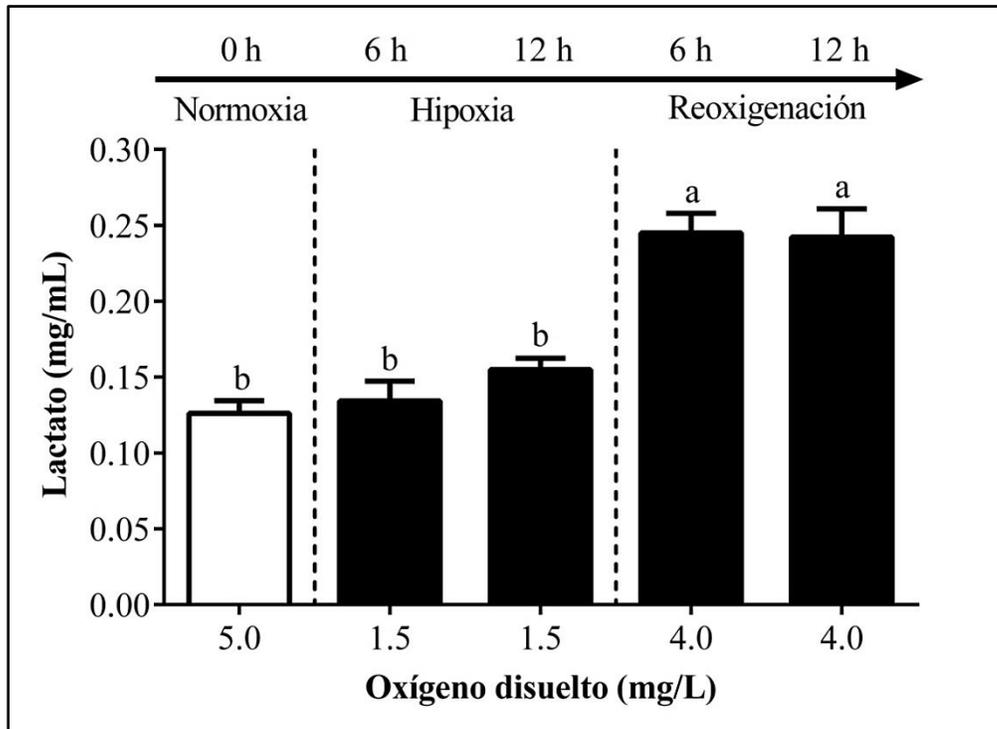
Estudios recientes sugieren que, durante las etapas avanzadas de la infección el aumento en el número de copias virales promueve una sobre-expresión del factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1), mediante la vía de la fosfatidilinositol-3 cinasa/proteína cinasa B/blanco de rapamicina en mamíferos (PI<sub>3</sub>K/AKT/mTOR) (Hernández-Palomares *et al.*, 2018; Miranda-Cruz *et al.*, 2018; Godoy-Lugo *et al.*, 2019). El HIF-1 es un factor de transcripción que regula la adaptación celular a la falta de oxígeno, a través del control de la expresión de diversos genes, como el *lvglut1*. Mientras que la vía de la PI<sub>3</sub>K/AKT/mTOR controla la síntesis proteica y el crecimiento celular, siendo activada por factores de crecimiento, hormonas y otros componentes extracelulares (Semenza, 2010). Estudios previos han descrito la activación del HIF-1 mediante la vía de la PI<sub>3</sub>K/AKT/mTOR en carcinomas y líneas celulares expuestas a infecciones virales, sugiriendo que es una de las alteraciones metabólicas que dan lugar al desarrollo del efecto Warburg (Shafee *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2015; Godoy-Lugo *et al.*, 2019).

Miranda-Cruz y colaboradores (2018) sugieren que el WSSV induce una respuesta tipo efecto

Warburg en el camarón blanco, a través de la vía PI<sub>3</sub>K/AKT/mTOR y la consiguiente activación del HIF-1, con la finalidad de aumentar la expresión y la actividad de las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa-SOD, glutatión S-transferasa-GST y catalasa). Esto se debe a que una mayor actividad de las enzimas antioxidantes permite reducir las especies reactivas de oxígeno y, por lo tanto, el estrés oxidativo a nivel celular, garantizando la correcta replicación viral (Miranda-Cruz *et al.*, 2018). Lo anterior sugiere que en el camarón blanco *L. vannamei*, la alteración metabólica tipo efecto Warburg podría ser una adaptación que ha desarrollado esta especie para contrarrestar las EROs. Por consiguiente, este tipo de respuesta metabólica también pudiera presentarse en camarones expuestos a factores que induzcan estrés oxidativo, como son los ciclos de hipoxia-reoxigenación y permitiría que estos organismos desarrollen una mayor adaptación a las condiciones adversas a las que están expuestos en los estuarios y granjas de cultivo camaronícolas. Los resultados de la cuantificación del *lvglut1* en la glándula digestiva, el L-lactato en plasma, así como la glucosa y el glucógeno en los tejidos de almacenamiento, sugieren que los camarones expuestos al WSSV presentan una respuesta lícita del tipo efecto Warburg.

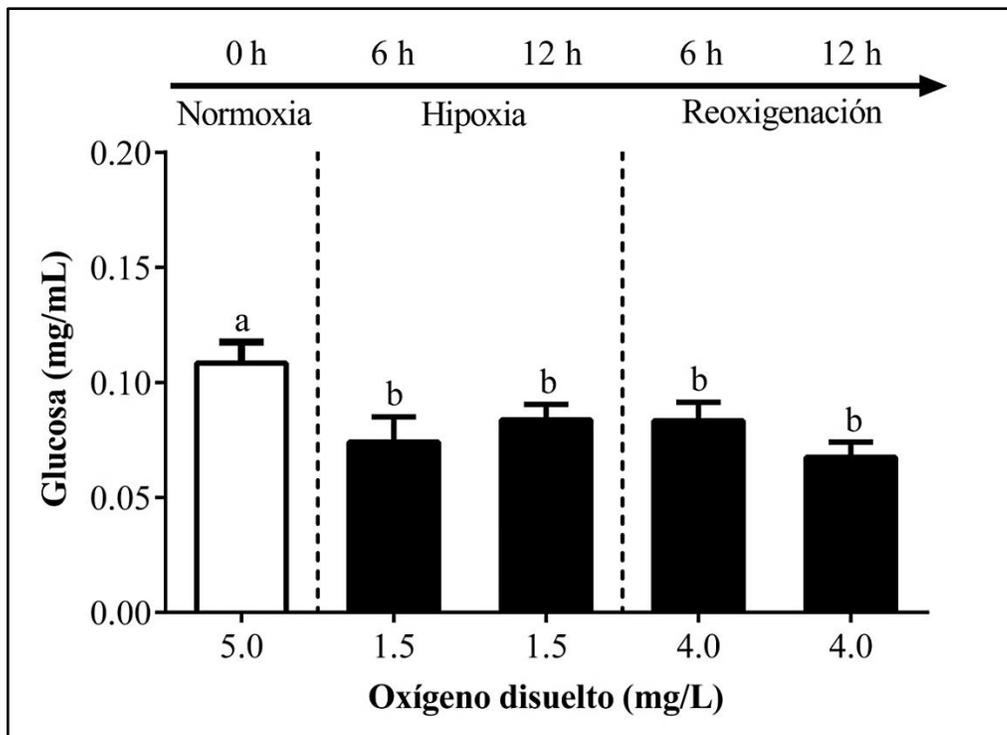
#### 6.5. Cuantificación de L-lactato y Glucosa en el Plasma de Camarones Expuestos a Hipoxia-Reoxigenación

Los niveles de L-lactato en el plasma de los camarones expuestos a hipoxia y reoxigenación mostraron un aumento significativo durante la fase de reoxigenación ( $p < 0.05$ ). Se detectaron valores promedio 1.9 veces más altos que los mostrados por los organismos en normoxia (Figura 14). A pesar de que se detectaron aumentos no significativos ( $p > 0.05$ ) en los niveles de plasmáticos de L-lactato durante la hipoxia, el incremento significativo ( $p < 0.05$ ) se detectó durante la reoxigenación ( $p < 0.05$ ), este resultado coincide con los hallazgos de Martínez-Cruz y colaboradores (2012), donde los niveles de L-lactato aumentaron durante la hipoxia y se mantuvieron elevados durante la reoxigenación, aún en presencia de oxígeno. En un estudio similar realizado por Chimeo-Nuñez (2017), también se encontró que las concentraciones de L-lactato aumentaron durante la reoxigenación y se mantuvieron constantes hasta las 24 h del restablecimiento de los niveles de oxígeno en camarón blanco expuesto a condiciones de hipoxia y reoxigenación por 24 h.



**Figura 14.** Concentración de L-lactato en el plasma de camarones juveniles *L. vannamei* expuestos a hipoxia-reoxigenación. ANOVA de una vía y prueba comparación de rangos múltiples de Fisher (LSD). Las barras representan las medias  $\pm$  EE. La barra correspondiente al tratamiento de Normoxia agrupa los valores obtenidos para el grupo testigo a las 0, 6, 12, 18 y 24 horas de tratamiento. Las barras de Hipoxia o Reoxigenación agrupan los valores observados para las tres tinas de los organismos expuestos a hipoxia-reoxigenación a las 6, 12, 18 y 24 horas de tratamiento. Diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Recientemente, en un trabajo en el que fueron evaluadas las respuestas bioquímicas de *L. vannamei* expuesto a 6 y 24 h de hipoxia, se encontró que después de un evento hipóxico ocurrió un aumento del L-lactato durante la reoxigenación (De Oliveira Lobato *et al.*, 2018). Los resultados de dicho estudio sugieren que la magnitud de la respuesta incrementa conforme es más prolongado el tiempo de exposición a condiciones de hipoxia. Esta respuesta metabólica coincide con las características descritas como efecto Warburg en los vertebrados ya que a pesar del restablecimiento de los niveles de oxígeno, el piruvato que se produce en la glucólisis, es fermentado a L-lactato por la vía anaeróbica.



**Figura 15.** Concentración de glucosa en el plasma de camarones juveniles *L. vannamei* expuestos a hipoxia-reoxigenación. ANOVA de una vía y prueba de comparación de rangos múltiples de Fisher (LSD). Las barras representan las medias  $\pm$  EE. La barra correspondiente al tratamiento de Normoxia agrupa los valores obtenidos para el grupo testigo a las 0, 6, 12, 18 y 24 horas de tratamiento. Las barras de Hipoxia o Reoxigenación agrupan los valores observados para las tres tinas de los organismos expuestos a hipoxia-reoxigenación a las 6, 12, 18 y 24 horas de tratamiento. Diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

La obtención de energía a través de la vía anaeróbica implica un aumento del flujo de la glucólisis para suplir las necesidades energéticas, puesto que por esta vía sólo se producen dos moléculas de ATP por glucosa degradada (Vázquez *et al.*, 2010). De acuerdo con lo anterior, los resultados de la concentración de glucosa en plasma mostraron que los organismos expuestos a condiciones de estrés (hipoxia-reoxigenación) presentan un mayor consumo de glucosa con respecto a los organismos en normoxia. La Figura 15 muestra la disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de los niveles plasmáticos de glucosa en los organismos tanto en hipoxia, como en reoxigenación, indicando una mayor utilización de este metabolito. Sin embargo, en ambas condiciones los valores de glucosa plasmática fueron constantes durante el experimento, sin un efecto aparente de la presencia o ausencia de oxígeno.

Este resultado muestra un comportamiento similar al observado en los camarones expuestos al

WSSV, lo cual sugiere que la glucosa plasmática es la primera fuente de energía utilizada por los tejidos, para responder a condiciones de estrés, y por tanto, el mantener una concentración estable de este metabolito en la hemolinfa es clave para el correcto funcionamiento celular (Zamora-Méndez, 2017). Los resultados de la cuantificación de la glucosa en plasma en el presente trabajo, coinciden con lo reportado por Aparicio-Simón y colaboradores (2018) para *L. vannamei* expuesto a 8 h de hipoxia, quienes observaron que los niveles de glucosa se mantuvieron constantes durante el tiempo de exposición al tratamiento, pero mostraron una tendencia a la disminución desde las 4 h de exposición a hipoxia. Sin embargo, en un estudio llevado a cabo por De Oliveira Lobato y colaboradores (2018), los niveles de glucosa de los organismos expuestos a hipoxia mostraron un aumento en la concentración de dicho metabolito en plasma durante la primera hora de reoxigenación, mientras que a las 6 h los valores de glucosa disminuyeron por debajo de los encontrados en los organismos del grupo testigo, como se observó en el presente estudio.

La disminución de la glucosa plasmática en los organismos expuestos a hipoxia-reoxigenación, respecto a los organismos del grupo testigo, coincide con una respuesta tipo Warburg, debido a que en los vertebrados, una de las principales características descritas para esta respuesta metabólica es el aumento en el consumo de glucosa (Warburg, 1956; Hernández-Díaz y Herrera-Burgos, 2002).

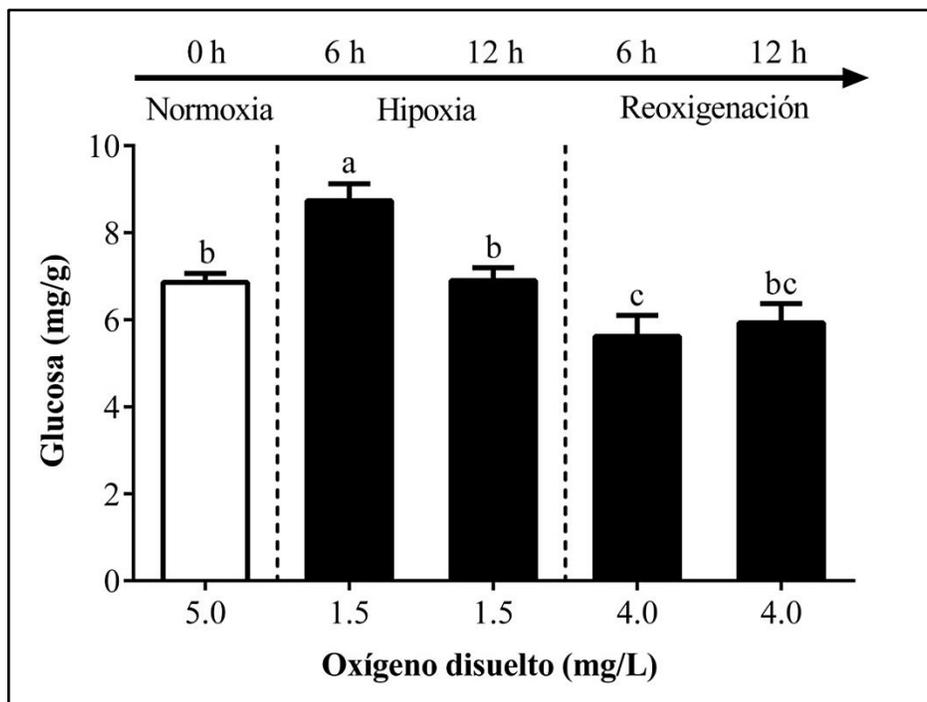
#### 6.6. Cuantificación de Glucosa, Glucógeno y ATP en la Glándula Digestiva de Camarones Expuestos a Hipoxia-Reoxigenación

Los resultados de la cuantificación de glucosa en la glándula digestiva (Figura 16) mostraron que los camarones en normoxia presentaron una media de 6.86 mg/g, siendo este valor semejante al encontrado en los organismos sanos del ensayo de infección, y similar a los reportados por Puente-Carreón (2009) para la misma especie.

En el presente estudio se detectaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) a las 6 h de hipoxia y 6 h de reoxigenación respecto a los organismos del grupo testigo. Se observó un incremento de 1.3 veces la concentración de la glucosa en la glándula digestiva a las 6 h de hipoxia respecto al grupo en normoxia; después, a las 12 h de hipoxia los niveles de glucosa disminuyeron significativamente ( $p < 0.05$ ) 1.6 veces con respecto a las 6 h. Durante la reoxigenación, después de las primeras 6 h se

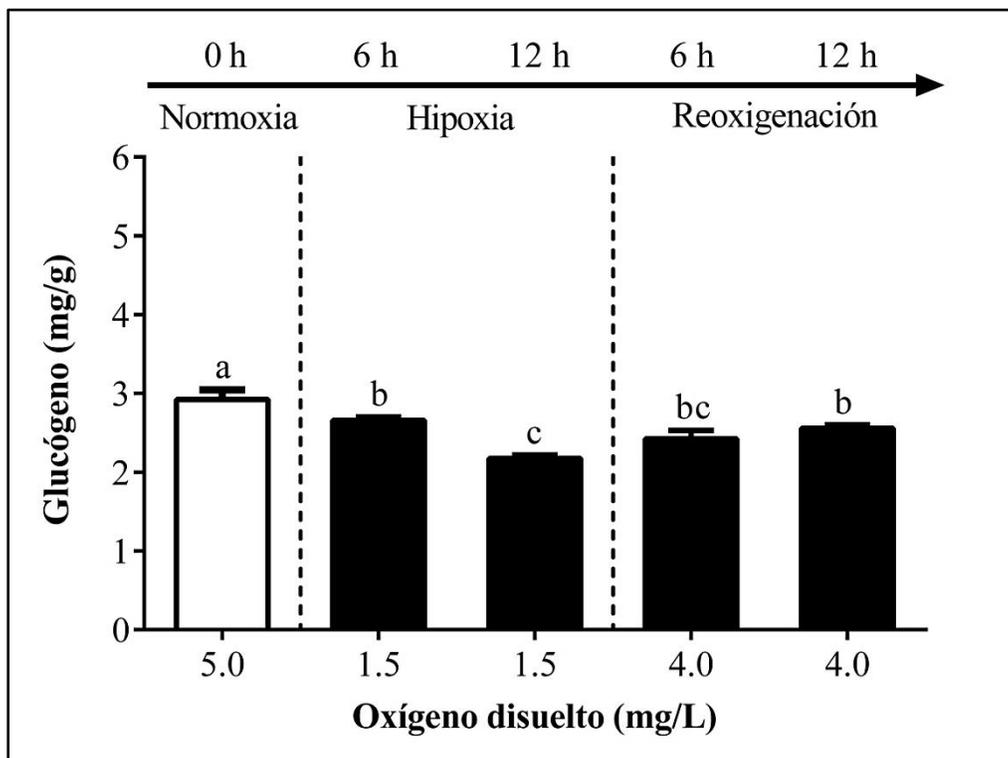
encontró una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de la glucosa en la glándula digestiva de los camarones tratados, manteniéndose constante hasta las 12 de reoxigenación (Figura 16).

Existen escasos reportes en el camarón blanco sobre el comportamiento de la glucosa en la glándula digestiva durante la exposición a hipoxia y reoxigenación, ya que generalmente se analizan las reservas de energía en forma de glucógeno o de carbohidratos totales o de la glucosa en plasma (Carreño-Mejía, 2009; Aparicio-Simón *et al.*, 2018; Miranda-Cruz *et al.*, 2018). En un estudio realizado por Martínez-Quintana y colaboradores (2016), se encontró un comportamiento distinto en camarones de la misma especie expuestos a 3, 24 y 48 h de hipoxia. Dichos autores encontraron que la concentración de glucosa se mantuvo constante en la glándula digestiva (Martínez-Quintana *et al.*, 2016).



**Figura 16.** Concentración de glucosa en la glándula digestiva de camarones juveniles *L. vannamei* expuestos a hipoxia-reoxigenación. ANOVA de una vía y prueba de comparación de rangos múltiples de Fisher (LSD). Las barras representan las medias  $\pm$  EE. La barra correspondiente al tratamiento de Normoxia agrupa los valores obtenidos para el grupo testigo a las 0, 6, 12, 18 y 24 horas de tratamiento. Las barras de Hipoxia o Reoxigenación agrupan los valores observados para las tres tinajas de los organismos expuestos a hipoxia-reoxigenación a las 6, 12, 18 y 24 horas de tratamiento. Diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Los resultados encontrados en el presente trabajo coinciden con lo reportado previamente en la literatura para otras especies. En el estudio realizado por Qiu y colaboradores (2011) en el cangrejo chino *Eriocheir sinensis* expuesto a 24 h de hipoxia, observaron que la glucosa en la glándula digestiva aumentó a las 2 h de iniciado el evento hipóxico, posteriormente disminuyó y se mantuvo constante durante todo el ensayo. Este comportamiento de la glucosa puede deberse a que la demanda energética de otros tejidos u órganos del camarón durante la hipoxia, no supera la capacidad del organismo para suplir glucosa, ya que la glándula digestiva es un órgano de reserva y por lo tanto, se observa que la glucosa puede incrementar o mantenerse constante.



**Figura 17.** Concentración de glucógeno en la glándula digestiva de camarones juveniles *L. vannamei* expuestos a hipoxia-reoxigenación. ANOVA de una vía y prueba de comparación de rangos múltiples de Fisher (LSD). Las barras representan las medias  $\pm$  EE. La barra correspondiente al tratamiento de Normoxia agrupa los valores obtenidos para el grupo testigo a las 0, 6, 12, 18 y 24 horas de tratamiento. Las barras de Hipoxia o Reoxigenación agrupan los valores observados para las tres tinajas de los organismos expuestos a hipoxia-reoxigenación a las 6, 12, 18 y 24 horas de tratamiento. Diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Respecto a los valores de glucógeno encontrados en la glándula digestiva, se observó que los organismos del grupo testigo mostraron un promedio de glucosa libre hidrolizada a partir del glucógeno de 2.92 mg/g, dicho valor se encuentra dentro del rango reportado por Rosas y colaboradores (2002) para *L. vannamei*, cuyo valor de referencia para el glucógeno en la glándula digestiva es de 2.69 mg/g. En este estudio, la concentración de glucógeno en la glándula digestiva disminuyó a las 6 y 12 h de hipoxia. El valor más bajo de glucógeno observado durante el ensayo se encontró después de 12 h de exposición a la hipoxia, con una disminución ( $p < 0.05$ ) de 1.34 veces con respecto a los organismos del grupo testigo y una disminución ( $p < 0.05$ ) de 1.17 veces con respecto a la media general de los tratamientos (Figura 17). Estos resultados indican que el glucógeno se está degradando a glucosa (Zamora-Méndez, 2017) y lo anterior se confirmó con el aumento de glucosa en la glándula digestiva en la misma condición.

Posteriormente durante la reoxigenación, la concentración de glucosa vuelve a disminuir y se mantiene constante, por su parte, el glucógeno incrementa. Estos resultados junto con los previamente descritos sobre el L-lactato y la glucosa en plasma, sugieren que a las 12 h de reoxigenación, los camarones se encontraban en un estado energéticamente favorable en donde la glucosa del plasma es estable, amortiguada por la glándula digestiva y el glucógeno aumenta, restableciéndose las reservas energéticas de los organismos.

La evaluación de la concentración del glucógeno en la glándula digestiva de los organismos en condiciones de reoxigenación mostró que hay una disminución significativa de este metabolito en los organismos tratados con respecto a los organismos que se encontraban en normoxia ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, respecto a la hipoxia, a las 6 h de reoxigenación se observó una tendencia al aumento en los niveles del glucógeno en la glándula digestiva, mientras que a las 12 h se observó un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en 1.2 veces de la concentración del glucógeno (Figura 17).

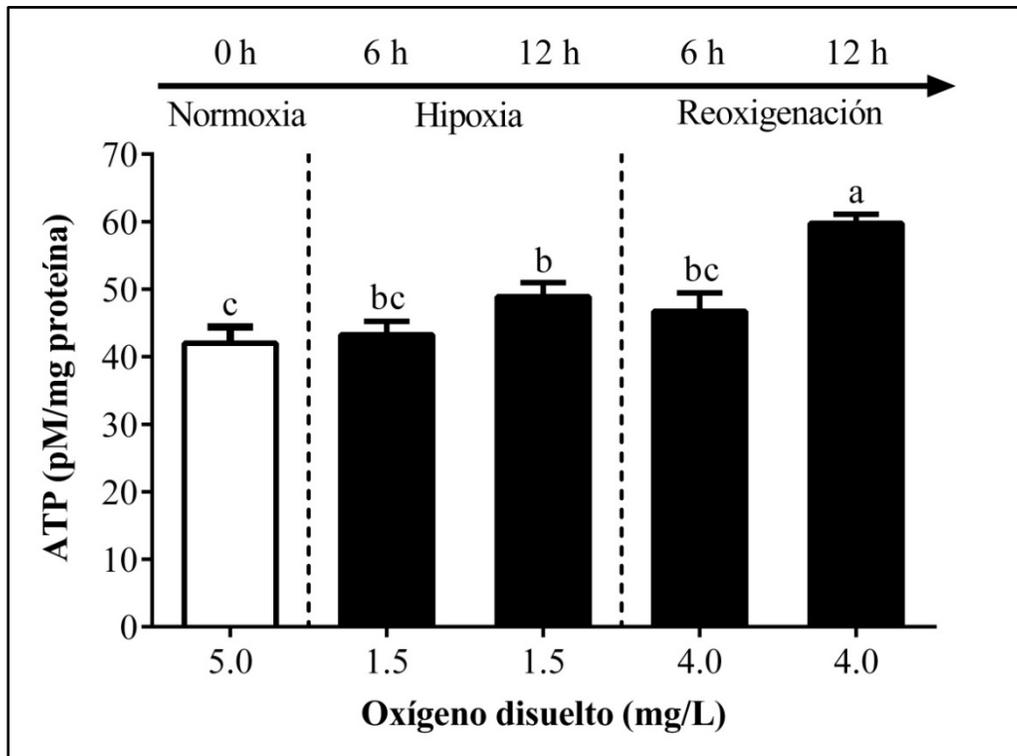
En resumen, se observó que, para mantener los niveles estables de glucosa en el plasma, existen cambios significativos a nivel de glucosa y glucógeno de la glándula digestiva que le permiten al organismo enfrentar los retos energéticos en estas condiciones hasta llegar a un estado estable. Lo anterior es congruente con lo obtenido por Ulaje-Fernández (2015) sobre la glucosa en plasma, quienes sugieren que durante la hipoxia-reoxigenación, hay una mayor utilización de las reservas de glucosa, almacenadas principalmente en forma de glucógeno.

En 2018, De Oliveira Lobato y colaboradores sugirieron que en la magnitud del cambio observado en las respuestas bioquímicas de los camarones *L. vannamei* expuestos a diferentes tiempos de

hipoxia, será mayor conforme el tiempo de exposición a la falta de oxígeno es más prolongado. Lo anterior sugiere que los organismos bajo esta condición ambiental presentan una mayor demanda energética en comparación con los organismos controles. Sin embargo, como se pudo observar en la Figura 14, durante la reoxigenación se observó un aumento sostenido en los niveles de L-lactato plasmático y teniendo en cuenta que en los camarones la glándula digestiva es el principal órgano donde se lleva a cabo la degradación y almacenamiento de los nutrientes consumidos en los alimentos, el comportamiento del glucógeno observado durante la reoxigenación, podría explicarse mediante el ciclo de Cori. El ciclo de Cori es una ruta para la síntesis *de novo* de la glucosa y comprende una serie de reacciones en las cuales el lactato es transformado en piruvato y de este a glucosa por gluconeogénesis. Posteriormente las moléculas de glucosa-6-fosfato resultantes pueden ser convertidas a glucógeno a través de la glucogénesis (García *et al.*, 1994), y de esta manera iniciar la recuperación de los valores basales de glucógeno.

El comportamiento del glucógeno en la glándula digestiva encontrado en el presente trabajo, coincide con estudios anteriores de *L. vannamei* expuesto a 3 h de hipoxia y posterior reoxigenación (Ulaje-Fernández, 2015). Asimismo, corresponde con lo descrito en otros crustáceos, como el camarón kuruma, igualmente expuesto a 6 h de hipoxia y posterior reoxigenación (Abe *et al.*, 2007). La degradación del glucógeno en la glándula digestiva, así como la tendencia encontrada en el L-lactato y la glucosa en plasma, sugieren que el camarón blanco presenta una respuesta tipo Warburg posterior a un evento hipóxico.

La cuantificación del ATP en la glándula digestiva de los organismos sometidos a condiciones de hipoxia-reoxigenación mostró que la concentración del ATP se mantuvo constante con incrementos significativos ( $p < 0.05$ ) después de 12 h de hipoxia y 12 h de reoxigenación. Los organismos del grupo testigo presentaron una concentración media de ATP de 42.01 pM/mg de proteína, mientras que los valores a las 12 h de hipoxia y de reoxigenación, mostraron ser 1.2 y 1.4 veces mayores, respectivamente, en relación al grupo en normoxia (Figura 18).



**Figura 18.** Concentración de ATP en la glándula digestiva de camarones juveniles *L. vannamei* expuestos a hipoxia-reoxigenación. ANOVA de una vía y prueba de comparación de rangos múltiples de Fisher (LSD). Las barras representan las medias  $\pm$  EE. La barra correspondiente al tratamiento de Normoxia agrupa los valores obtenidos para el grupo testigo a las 0, 6, 12, 18 y 24 horas de tratamiento. Las barras de Hipoxia o Reoxigenación agrupan los valores observados para las tres tinas de los organismos expuestos a hipoxia-reoxigenación a las 6, 12, 18 y 24 horas de tratamiento. Diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

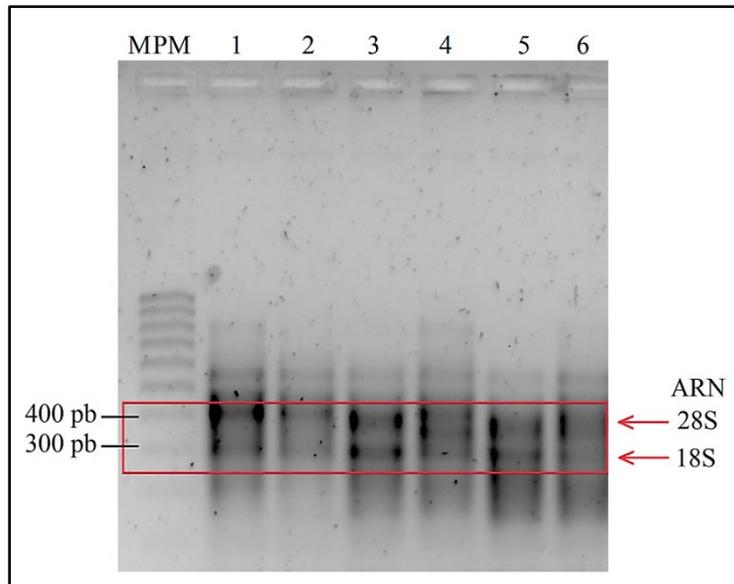
Existen pocos reportes sobre las concentraciones de ATP en los tejidos de camarón incluyendo a la glándula digestiva. Con el aumento del L-lactato y la baja producción de ATP por la vía anaeróbica, era de esperarse que los niveles de ATP bajarán por efecto de la hipoxia y la reoxigenación; sin embargo, en los estudios reportados previamente por Martínez-Cruz (2012) y Chimeo-Núñez (2017) en músculo y pleópodos, se encontró una tendencia sin cambio en los niveles de ATP durante la exposición a estas condiciones. El comportamiento del ATP en la glándula digestiva encontrado en el presente estudio, tanto para los camarones expuestos al WSSV como a hipoxia-reoxigenación, mostró que este metabolito tiende a mantenerse constante o a aumentar como se describió previamente para los organismos infectados con el WSSV; lo anterior podría deberse al uso de la glutamina y los fosfágenos como fuentes alternas para la obtención de energía (Astrofsky *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2014).

En el caso de los camarones expuestos a hipoxia-reoxigenación, el incremento observado para el ATP a las 12 h de reoxigenación, coincidió con el aumento en los niveles del glucógeno y la estabilización de la glucosa tanto en el plasma, como en la glándula digestiva, confirmando que en este tiempo los camarones se encontraban en un estado metabólico estable. Sin embargo, el comportamiento del ATP en la glándula digestiva de *L. vannamei* expuesto hipoxia y reoxigenación no coincidió con los incrementos observados en las concentraciones de L-lactato y no cumplió con lo esperado en una respuesta tipo Warburg. Estudios previos que han analizado el control de la síntesis de ATP en células cancerosas bajo el efecto Warburg, no han logrado aclarar la ruta de aporte de ATP, ya sea la glucólisis por la vía anaerobia ó la fosforilación oxidativa por la vía aerobia, pues existen resultados contradictorios al respecto (Xu *et al.*, 2015).

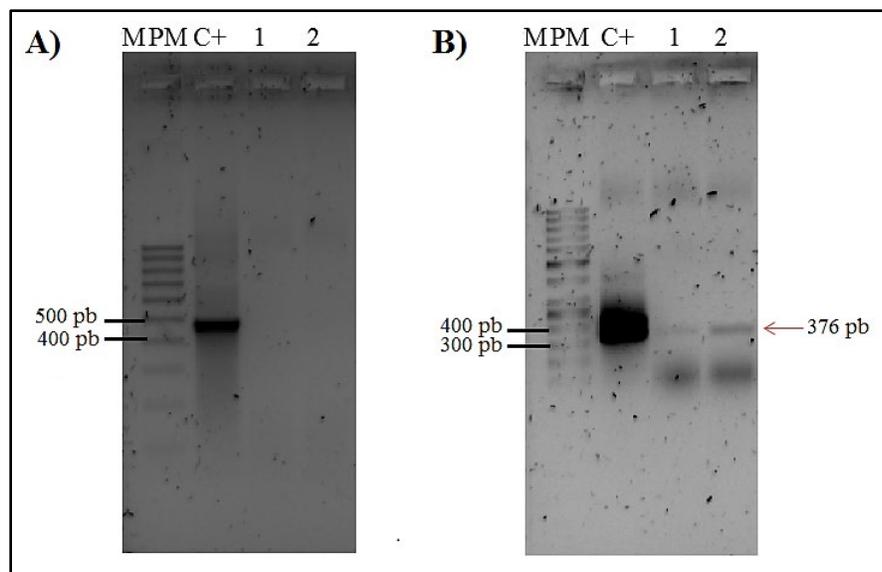
Como ya se mencionó previamente en este estudio, en el camarón, además de las dos rutas mencionadas, existen dos fuentes alternas de ATP que podrían dar explicación a los niveles sostenidos de esta molécula en ambos experimentos realizados: 1) el uso de la glutamina para la obtención de energía como se ha reportado en células tumorales (Yu *et al.*, 2011), y/o 2) el uso de fosfágenos, en específico la arginina-fosfato, cuya presencia ha sido confirmada en la glándula digestiva de los crustáceos, misma que podría inducir la síntesis de ATP en respuesta al estrés oxidativo (Astrofsky *et al.*, 2002; Martínez-Cruz *et al.*, 2012; Fan *et al.*, 2019). Un estudio reciente de Wang y colaboradores (2019), se reportó que en *L. vannamei* la infección con el WSSV promueve el uso de la glutamina e induce una respuesta tipo efecto Warburg. Con base en lo anterior, respecto al ATP no es posible descartar, ni confirmar la ocurrencia de una respuesta tipo Warburg en los camarones como respuesta a la hipoxia y reoxigenación.

#### 6.7. Evaluación de la Expresión Absoluta del ARNm del Transportador GLUT1 (*lvglut1*) en la Glándula Digestiva del Camarón Expuestos a Hipoxia-Reoxigenación

Para el análisis de la expresión absoluta del gen *lvglut1* en la glándula digestiva de camarones expuestos hipoxia-reoxigenación, se confirmó la integridad del ARN total de todas las muestras (Figura 19).

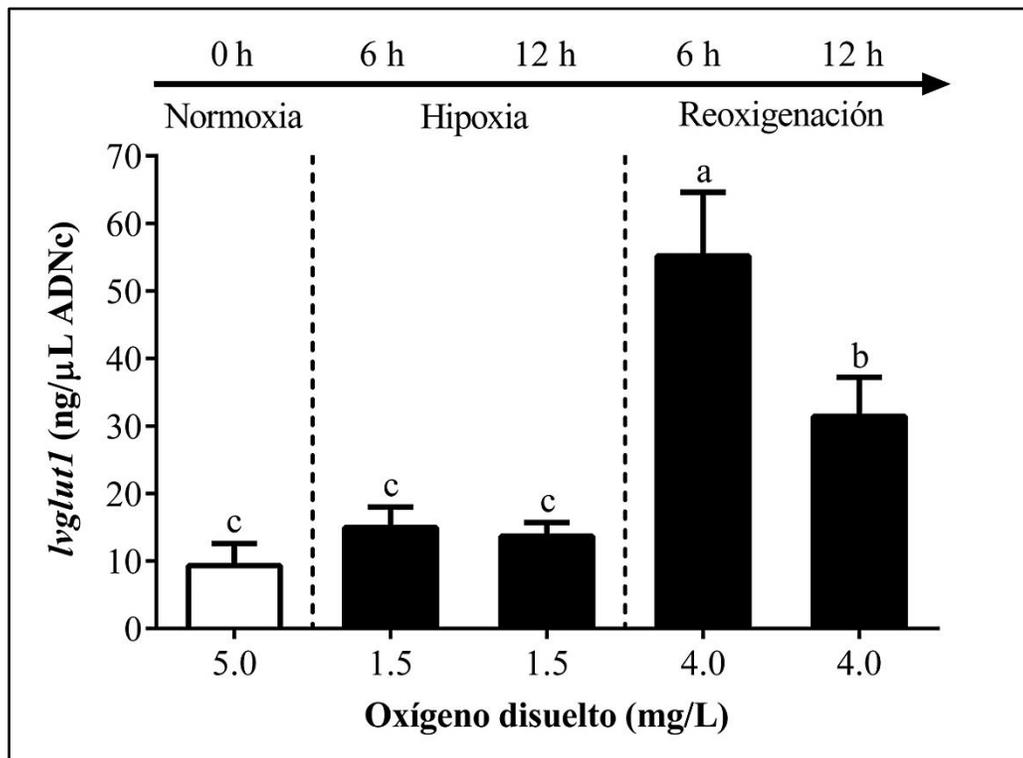


**Figura 19.** Integridad del ARN total aislado de la glándula digestiva de camarones juveniles *L. vannamei* expuestos a hipoxia-reoxigenación. MPM: marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA). Carriles 1-4: ARN total aislado de muestras control. Carriles 5-6: ARN total aislado de organismos expuestos a hipoxia.



**Figura 20.** **A)** Eliminación del ADNg en el ARN total aislado de la glándula digestiva de camarones juveniles *L. vannamei* expuestos a hipoxia-reoxigenación. MPM: marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA). C+: ADNg aislado de la glándula digestiva de *L. vannamei*. Carriles 1-2: ARN total aislado de organismos expuestos a hipoxia. **B)** Comprobación de la síntesis del ADNc a partir del ARN total. MPM: marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA). C+: ADNc obtenido de ARN total de la glándula digestiva de *L. vannamei*. Carriles 1-2: ADNc de organismos expuestos a hipoxia.

Posteriormente se procedió a la eliminación del ADNg y la ausencia de bandas corroboró que el ARN total estaba libre de contaminación con ADNg (Figura 20A). Una vez que se comprobó que todas las muestras de ARN total estaban íntegras y no presentaban ADNg, se realizó la síntesis del ADNc, mismo que fue usado como templado para la amplificación por PCR de un fragmento de 376 pb (Figura 20B).



**Figura 21.** Expresión del acarreador de glucosa *lvglut1* en la glándula digestiva de camarones juveniles *L. vannamei* expuestos a hipoxia-reoxigenación. ANOVA de una vía y prueba de comparación de rangos múltiples de Fisher (LSD). Las barras representan las medias  $\pm$  EE. La barra correspondiente al tratamiento de Normoxia agrupa los valores obtenidos con 250 ng de ADNc para el grupo testigo a las 0, 6, 12, 18 y 24 horas de tratamiento. Las barras de Hipoxia o Reoxigenación agrupan los valores observados con 250 ng de ADNc para las tres tinas de los organismos expuestos a hipoxia-reoxigenación a las 6, 12, 18 y 24 horas de tratamiento. Diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

El análisis de la expresión absoluta por qRT-PCR del *lvglut1* en la glándula digestiva del camarón blanco expuesto hipoxia-reoxigenación, no mostró cambios significativos ( $p > 0.05$ ) en la expresión del gen por efecto de la hipoxia; sin embargo, durante la reoxigenación se encontró un aumento

significativo ( $p < 0.05$ ) en la concentración del transcrito *lvglut1*. Los valores más altos de *lvglut1* se detectaron a las 6 h de reoxigenación, presentando una media de 55.19 ng/ $\mu$ L ARNm, el cual representa un incremento aproximado de 6 veces respecto al grupo en normoxia. Después de 12 h del restablecimiento de los niveles de oxígeno, el número de transcritos del gen continuó siendo superior a los animales del grupo testigo, pero disminuyó 1.8 veces con respecto a las 6 h de reoxigenación, presentando una media de 31.4 ng/ $\mu$ L ARNm (Figura 21).

Hasta la fecha, no existen estudios previos sobre expresión del *lvglut1* durante la reoxigenación en el camarón blanco *L. vannamei*; sin embargo, sí se ha reportado su comportamiento bajo condiciones de hipoxia y su papel en la infección con el WSSV (Huang *et al.*, 2015; Martínez-Quintana *et al.*, 2014; Martínez-Quintana *et al.*, 2016). Los cambios observados después del restablecimiento de los niveles de oxígeno son importantes, ya que bajo esta condición se desarrolla el efecto Warburg en los vertebrados. Los resultados de este trabajo coinciden parcialmente con los reportados por Martínez-Quintana y colaboradores (2014; 2016) para la glándula digestiva de *L. vannamei* expuesto a hipoxia. Dichos autores refieren que la expresión del *lvglut1* desde las 3 h de exposición a hipoxia se mantiene constante hasta finalizado el estudio a las 48 h; mientras que, en el presente estudio, no hay de la hipoxia en ninguno de los tiempos evaluados sobre la expresión del gen *lvglut1*. Por otra parte, el aumento significativo en la expresión del *lvglut1* durante la reoxigenación puede deberse a la activación del HIF-1 por acción de la hormona hiperglucémica de los crustáceos, cuya síntesis y liberación es activada por un aumento del lactato en plasma y en el presente trabajo el L-lactato plasmático solo aumentó durante la reoxigenación (Figura 14).

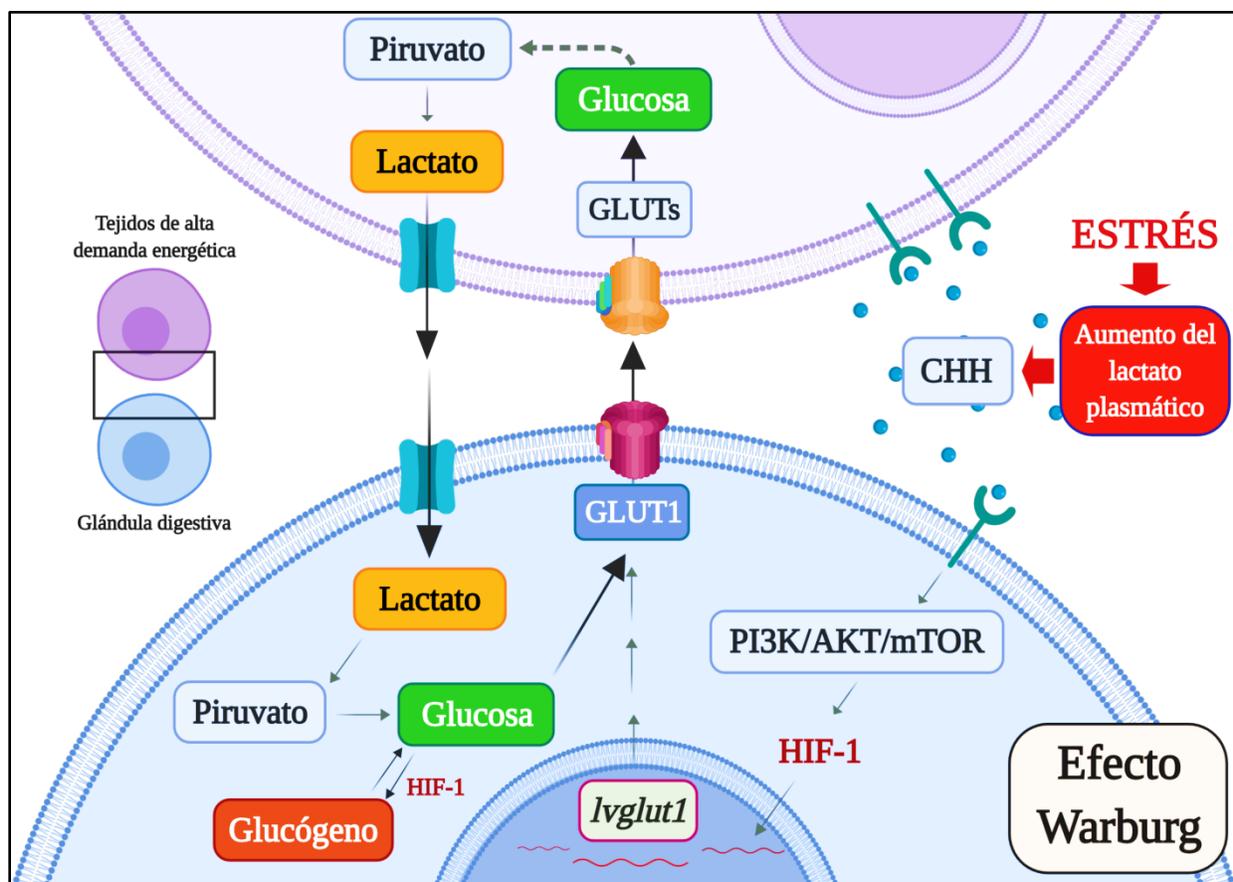
En conjunto, los resultados obtenidos cuando el camarón blanco *L. vannamei* es sometido a condiciones de hipoxia-reoxigenación, mostraron una disminución de la glucosa en plasma y del glucógeno almacenado en la glándula digestiva; así como un aumento del L-lactato plasmático y de la expresión del transportador *lvglut1* en la glándula digestiva durante la reoxigenación y valores relativamente constantes de la glucosa en dicho tejido. Estos resultados sugieren que las células de los camarones expuestos a la hipoxia-reoxigenación, presentan una respuesta tipo Warburg, aún en ausencia de un proceso patológico como en el caso de las células cancerosas de los vertebrados.

En *L. vannamei* esta respuesta tipo Warburg puede estar asociada a la acción sinérgica entre los tejidos de alta demanda energética, como es el músculo, las branquias y la glándula digestiva en respuesta a las hormonas producidas por el órgano X de los camarones, específicamente por la acción de la hormona hiperglucémica de los crustáceos. La hormona hiperglucémica de los

crustáceos se libera en respuesta a diversos factores de estrés que van desde la emersión, la infección por parásitos o virus, hasta la exposición a hipoxia-reoxigenación (Stentiford *et al.*, 2001; Webster *et al.*, 2012). Ante un aumento del lactato en plasma, se produce una retroalimentación positiva que activa la síntesis y la liberación de la CHH por el órgano X (Stentiford *et al.*, 2001); lo anterior desencadena una cascada de señalización que incluye la activación de la vía PI<sub>3</sub>K/AKT/mTOR, a través de la cual se regulan diversos procesos metabólicos como la síntesis proteica y la activación del HIF-1. La estabilización de los niveles de este factor activa la transcripción de diversos genes como los que codifican para el GLUT1, la hexocinasa (HK), la piruvato deshidrogenasa cinasa y la LDH (Semenza, 2010; Johnson y Perkins, 2012; Miranda-Cruz *et al.*, 2018). Se ha reportado la estabilización de los niveles del HIF-1, aún en microambientes con oxígeno disponible, debido a la presencia de EROs, factores de crecimiento u hormonas, muchas de las cuales actúan mediante la vía PI<sub>3</sub>K/AKT/mTOR (Richard *et al.*, 2000).

La integración de los resultados de este estudio y hallazgos previos en el camarón blanco, sugieren un mecanismo representado en la Figura 22, en donde el aumento de la CHH en respuesta al incremento del lactato plasmático, podría activar al HIF-1 mediante la vía de la PI<sub>3</sub>K/AKT/mTOR, en presencia de oxígeno durante la reoxigenación. Lo anterior provocaría un aumento de los transcritos del *lvglut1* y la síntesis de su proteína en la membrana plasmática. Un aumento de los transportadores GLUT1 en las membranas celulares de la glándula digestiva propiciaría un mayor flujo de la glucosa hacia la hemolinfa, observándose una disminución del glucógeno y la glucosa en la glándula digestiva durante la reoxigenación con respecto a los organismos en normoxia.

El agotamiento de las reservas energéticas a nivel de tejido, se traducen entonces en una mayor disponibilidad de la glucosa a nivel de la hemolinfa, debido al aumento de la expresión del *lvglut1*. Sin embargo, los niveles de glucosa en el plasma varían constantemente, ya que están determinados por el aumento de la glucosa a partir de los órganos de reserva como la glándula digestiva y por la demanda energética de los tejidos como el músculo, las branquias y los pleópodos. Si la demanda energética es muy alta, como ocurre con durante el desarrollo del efecto Warburg, es posible que sólo se detecte una disminución de la concentración de la glucosa plasmática, ya que solo se están produciendo dos moléculas de ATP por cada glucosa degradada.



**Figura 22.** Mecanismo molecular propuesto para el efecto Warburg en el camarón blanco *L. vannamei* expuesto a hipoxia-reoxigenación o a la infección con el WSSV. El desarrollo de la respuesta metabólica tipo efecto Warburg podría resultar de la sinergia entre los tejidos de almacenamiento y los tejidos de alta demanda energética de los camarones, desencadenándose en respuesta al aumento en plasma de los niveles de lactato y CHH.

El exceso de lactato generado por los tejidos de alta demanda energética, puede ser utilizado para la producción de glucosa a partir del piruvato obtenido mediante el ciclo de Cori o a partir de la glutamina. En dependencia del estado energético de los organismos, la glucosa sintetizada *de novo* puede ser convertida en glucógeno y de esta manera ser almacenada en la glándula digestiva o puede ser exportada a la hemolinfa para suplir la demanda de energía de otros tejidos u órganos (García *et al.*, 1994; Zamora-Méndez, 2017; Figura 22).

Así, el conjunto de respuestas bioquímicas de la célula descritas como efecto Warburg en vertebrados, se presentan en su mayoría en el camarón blanco, tanto por la presencia de una infección viral, como en los organismos expuestos a un evento de hipoxia-reoxigenación. En este caso, dichas respuestas pueden representar un mecanismo que les permite a los organismos seguir

desarrollándose con cierto nivel de independencia sobre la disponibilidad de altas o bajas concentraciones de oxígeno ambiental. Lo anterior se ha sugerido como una ventaja del efecto Warburg en las células cancerígenas (Gogvadze *et al.*, 2010), pues permitiría que los camarones se adapten a los constantes ciclos de hipoxia-reoxigenación a los que están expuestos en los estuarios y tanques de cultivo camarícolas y sean capaces de desarrollarse bajo estas condiciones adversas.

## 7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los camarones expuestos a la infección con el WSSV o ante condiciones de hipoxia-reoxigenación, coinciden con las características de una respuesta tipo efecto Warburg en los vertebrados. Dicha respuesta metabólica en *L. vannamei* podría representar una ventaja adaptativa que le permite al camarón enfrentar diferentes condiciones de estrés que se presentan diariamente tanto en los estuarios como en las granjas de cultivo.

## 8. RECOMENDACIONES

Las respuestas tipo efecto Warburg son alteraciones metabólicas complejas que involucran a diversos metabolitos y enzimas; por lo que para una mejor comprensión de este fenómeno fisiológico en el camarón blanco *L. vannamei* sería recomendable abordar en futuros trabajos el comportamiento de la arginina cinasa o de los niveles de lípidos y proteínas en la glándula digestiva, que esclarezcan los resultados de la cuantificación del ATP mostrados en el presente trabajo. Así como también, sería de mucha importancia realizar el análisis de la actividad del HIF-1, la LDH y el LvGLUT1, para una mejor integración de los factores involucrados en la respuesta tipo Warburg en *L. vannamei*.

## 9. REFERENCIAS

- Abe H., Hirai S. and Okada S. (2007). Metabolic responses and arginine kinase expression under hypoxic stress of the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 146(1): 40-46.
- Ahuejote-Sandoval M. (2004). Estrés oxidativo en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en respuesta a hipoxia y reoxigenación. (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz, B.C.S., México.
- Altman B. J., Stine Z. E. and Dang C. V. (2016). From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 16(10): 619.
- Alberts B., Lewis J., Bray D., Raff M., Roberts K. and Watson J.D. (2010). *Biología Molecular de la Célula*. Ediciones Omega S.A. Tercera edición. Barcelona, España. 699-765 pp.
- Amado-Álvarez J., Pérez-Cutillas P., Alatorre-Cejudo L. C., Ramírez-Valle, O., Ortega, E. F. S., and Alarcón-Cabañero, J. J. (2019). Análisis multiespectral para la estimación de la turbidez como indicador de la calidad del agua en embalses del estado de Chihuahua, México. *Revista Geográfica de América Central*. 1(62): 49-77.
- Untergasser A., Nijveen H., Rao X., Bisseling T., Geurts R. and Leunissen J.A.M. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic acids research*. 35(2): W71-W74.
- Aparicio-Simón B., Piñón M., Racotta R. and Racotta I. S. (2018). Neuroendocrine and metabolic responses of Pacific whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* exposed to hypoxia stress. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 46(2): 364-376.
- Astrofsky K. M., Roux M. M., Klimpel K. R., Fox J. G. and Dhar A. K. (2002). Isolation of differentially expressed genes from white spot virus (WSV) infected Pacific blue shrimp (*Penaeus stylirostris*). *Archives of Virology*. 147(9): 1799-1812.
- Belley R., Archambault P., Sundby B., Gilbert F. and Gagnon J.-M. (2010). Effects of hypoxia on benthic macrofauna and bioturbation in the Estuary and Gulf of St. Lawrence, Canada. *Continental Shelf Research*. 30(12): 1302-1313.
- Bustin S. A., Benes V., Garson J. A., Hellems J., Huggett J., Kubista M., Shipley G. L. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*. 55(4): 611-622.
- Carreño-Mejía, A. (2009). Influencia del estrés por hipertermia a corto plazo sobre índices fisiológicos, inmunológicos y celulares en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. (Tesis de maestría). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, CIBNOR S.C., La Paz, B.C.S., México.
- Cisterna J. A., Saldías G. S. and Cáceres C. W. (2008). Efecto de la hipoxia en la conducta de forrajeo de *Cancer setosus* (Molina, 1782) (Crustacea: Decapoda) alimentado con *Mytilus chilensis* (Hupé, 1854). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 43(2): 419-423.
- Colombo S. L., Palacios-Callender M., Frakich N., De Leon J., Schmitt C. A., Boorn L. and

- Moncada S. (2010). Anaphase-promoting complex/cyclosome-Cdh1 coordinates glycolysis and glutaminolysis with transition to S phase in human T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107(44): 18868-18873.
- Chen I. T., Aoki T., Huang, Y. T., Hirono I., Chen T., Huang J. Y., Chang G.D., Lo C. F. and Wang, H. C. (2011). White spot syndrome virus induces metabolic changes resembling the Warburg effect in shrimp hemocytes in the early stage of infection. *Journal of Virology*. 85(24): 12919-12928.
- Chen K. Y., Hsu T. C., Huang, P. Y., Kang S. T., Lo C F., Huang W. P. and Chen L. L. (2009). *Penaeus monodon* chitin-binding protein (PmCBP) is involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection. *Fish & Shellfish Immunology*. 27(3): 460-465.
- Chen W. Y., Ho. K. C., Leu J. H., Liu K. F., Wang H. C., Kou G. H. and Lo C. F. (2008). WSSV infection activates STAT in shrimp. *Developmental & Comparative Immunology*. 32(10): 1142-1150.
- Chimeo-Núñez, C. (2017). El inhibidor endógeno IF1 del complejo mitocondrial ATPasa y su papel en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* durante la hipoxia-reoxigenación. (Tesis doctoral). Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo A. C., Hermosillo., Sonora, México.
- Chimeo-Núñez C., Fernández-Giménez A. V., Campanella M., Méndez-Romero O. and Muhlia-Almazán A. (2015). The shrimp mitochondrial FoF1-ATPase inhibitory factor-1 (IF<sub>1</sub>). *Journal of Bioenergetics & Biomembranes*. 47(5): 383-393.
- Chomczynski P. and Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 162(1): 156-159.
- Courtney R., Ngo D. C., Malik N., Ververis K., Tortorella S. M. and Karagiannis T. C. (2015). Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. *Molecular Biology Reports*. 42(4): 841-851.
- De Alteriis E., Carteni F., Parascandola P., Serpa J. and Mazzoleni S. (2018). Revisiting the Crabtree/Warburg effect in a dynamic perspective: a fitness advantage against sugar-induced cell death. *Cell Cycle*. 17(6): 688-701.
- De Oliveira Lobato R. C., Josende M. E., Tavares P. B., Wasielesky W., Maciel F. E. and Ventura-Lima J. (2018). Lipoic acid modulates energetic metabolism and antioxidant defense systems in *Litopenaeus vannamei* under hypoxia/reoxygenation conditions. *Aquaculture*. 497: 396-404.
- Díaz-Ruíz R., Rigoulet M. and Devin A. (2011). The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1807(6): 568-576.
- Escobedo-Bonilla C. M., Wille M., Sanz V. A., Sorgeloos P., Pensaert M. and Nauwynck, H. (2005). *In vivo* titration of white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen-free *Litopenaeus vannamei* by intramuscular and oral routes. *Diseases of Aquatic Organisms*. 66(2): 163-170.
- Fan L., Wang L. and Wang, Z. (2019). Proteomic characterization of the hepatopancreas in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* under cold stress: Revealing the organism

homeostasis mechanism. *Fish & Shellfish Immunology*. 92: 438-449.

FAO (2017). Anuario de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Estadísticas de pesca y acuicultura 2017. Roma, Italia. 30-51 pp.

INAPESCA (2018). Acuicultura: Camarón Blanco del Pacífico. Instituto Nacional de Pesca (INAPESCA). Consultado de <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuicultura-camaron-blanco-del-pacifico>.

Ulaje-Fernández S. A. (2015). Relación entre respuestas fisiológicas, contenido bioquímico y expresión del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) ante cambios agudos y crónicos de hipertermia e hipoxia. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, CIBNOR S.C., La Paz, B.C.S., México.

Moreno-Figueroa L. D. (2017). Cultivo intensivo foto-heterotrófico del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) en alta salinidad con reposición mínima de agua. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, CIBNOR S.C., La Paz, B.C.S., México.

Flegel T. W., Lightner D. V., Lo C. F. and Owens L. (2008). Shrimp disease control: past, present and future. *Diseases in Asian Aquaculture VI*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society. Manila, Philippines. (1): 355-378.

Flores C. M., Del Angel E., Frías D. M. and Gómez A. L. (2018). Evaluation of Physicochemical Parameters and Heavy Metals in Water and Surface Sediment in the Ilusiones Lagoon, Tabasco, Mexico. *Tecnología y Ciencias del Agua*. 9(2): 1-18.

García C. K., Goldstein J. L., Pathak R. K., Anderson R. G. and Brown M. S. (1994). Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, pyruvate, and other monocarboxylates: implications for the Cori cycle. *Cell*. 76(5): 865-873.

García-Orozco K. D., Aispuro-Hernández E., Yepiz-Plascencia G., Calderon-de-la-Barca A. M. and Sotelo-Mundo R. R. (2007). Molecular characterization of arginine kinase, an allergen from the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *International archives of allergy and immunology*. 144(1): 23-28.

Godoy-Lugo J. A., Miranda-Cruz M. M., Rosas-Rodríguez J. A., Adan-Bante N. P., Icedo-García R. and Soñáñez-Organis J. G. (2019). Hypoxia inducible factor-1 regulates WSSV-induced glycolytic genes in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*. 92: 165-171.

Gogvadze V., Zhivotovsky B. and Orrenius, S. (2010). The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells. *Molecular Aspects of Medicine*. 31(1): 60-74.

Gruenewald S., Rennefahrt U., Maldonado S. G., Walter A., Petrul H., Héroult M., Buchmann B. (2015). Metabolic responses in cancer cells with differential susceptibility to GLUT1 inhibition. AACR 106th Annual Meeting 2015. *Cancer Research*. 75(15): 1164-1164.

Herrera-Salvatierra N., Pascual-Jiménez C., Huchin-Mian J. P., Lozano-Álvarez E., Montero-Muñoz J., Briones-Fourzán P. and Rodríguez-Canul R. (2019). Nutritional and immunological evaluation of juvenile spiny lobsters *Panulirus argus* (Latreille, 1804) (Decapoda: Achelata: Palinuridae) naturally infected with the PaV1 virus. *Journal of Crustacean Biology*. 39(2): 162-171.

Hernández-Díaz D. P. and Herrera-Burgos, L. C. (2002). ¿Cómo se transporta la glucosa a través

de la membrana celular? *Iatreia*. 15(3): 179-189.

- Hernández-Palomares M., Godoy-Lugo J., Gómez-Jiménez S., Gámez-Alejo L., Ortiz R., Muñoz-Valle J. and Soñánez-Organis J. (2018). Regulation of lactate dehydrogenase in response to WSSV infection in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*. 74: 401-409.
- Hernández-Pérez A. (2012). Dinámica de infección del virus del Síndrome de la mancha blanca (WSSV), en hemocitos de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). (Tesis de maestría). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, CIBNOR S.C., Guaymas, Sonora, México.
- Hensley C. T., Wasti A. T., and DeBerardinis R. J. (2013). Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *The Journal of Clinical Investigation*. 123(9): 3678-3684.
- Hsieh T. J., Wang J. C., Hu C. Y., Li C. T., Kuo C. M. and Hsieh S. L. (2008). Effects of Rutin from *Toona sinensis* on the immune and physiological responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under *Vibrio alginolyticus* challenge. *Fish & Shellfish Immunology*. 25(5): 581-588.
- Huang H. T., Chan H. L., Shih T.Y. and Chen L. L. (2015). A study of the role of glucose transporter 1 (Glut1) in white spot syndrome virus (WSSV) infection. *Fish & Shellfish Immunology*. 46(2): 305-314.
- Industria Acuícola, I. (2012). Sinaloa, líder de la producción de camarón de cultivo en México. *Industria Acuícola: Acuicultura y Negocios de México*. 8(5): 18-20.
- Jacot D., Waller R. F., Soldati-Favre D., MacPherson D. A. and MacRae J. I. (2016). Apicomplexan energy metabolism: carbon source promiscuity and the quiescence hyperbole. *Trends in Parasitology*. 32(1): 56-70.
- Johnson R. F. and Perkins N. D. (2012). Nuclear factor- $\kappa$ B, p53, and mitochondria: regulation of cellular metabolism and the Warburg effect. *Trends in Biochemical Sciences*. 37(8): 317-324.
- Kim C. S., Choi S. H., Kim M. S. and Kim K. H. (2014). Resistance against white spot syndrome virus (WSSV) infection in wild marine crab *Gaeticus depressus* by injection of recombinant VP28 protein. *Journal of Fish Pathology*. 27(1): 11-16.
- King M. (2013). *Fisheries biology, assessment and management*. Blackwell Publishing Company Segunda edición. Victoria, Australia. 49 pp.
- Koch A., Lang S. A., Wild P. J., Gantner S., Mahli A., Spanier G., Berneburg M., Müller M. Bosserhoff A. K. and Hellerbrand C. (2015). Glucose transporter isoform 1 expression enhances metastasis of malignant melanoma cells. *Oncotarget*. 6(32): 32748-32760.
- Kovačević Z. and Morris H. P. (1972). The role of glutamine in the oxidative metabolism of malignant cells. *Cancer Research*. 32(2): 326-333.
- Lan, Y. S., Xu, X., Yang, F., & Zhang, X. (2006). Transcriptional profile of shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes with DNA microarray. *Archives of Virology*. 151(9): 1723-1733.
- Li K., Liu L., Clausen J. H., Lu M. and Dalsgaard A. (2016). Management measures to control

- diseases reported by tilapia (*Oreochromis* spp.) and whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farmers in Guangdong, China. *Aquaculture*. 457: 91-99.
- Liu S. T., Hendifar A. E. and Wolin E. M. (2015). Novel Targets for Future Medical Treatments. In *Management of Pancreatic Neuroendocrine Tumors*. Springer. New York, United States of America. 145-162 pp.
- Loor G., Kondapalli J., Iwase H., Chandel N. S., Waypa G. B., Guzy R. D. and Schumacker P. T. (2011). Mitochondrial oxidant stress triggers cell death in simulated ischemia–reperfusion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 1813(7): 1382-1394.
- López-Zavala A. A., García-Orozco K. D., Carrasco-Miranda J. S., Sugich-Miranda R., Velázquez-Contreras E. F., Criscitiello M. F., Brieba L. G. and Sotelo-Mundo R. R. (2013). Crystal structure of shrimp arginine kinase in binary complex with arginine—a molecular view of the phosphagen precursor binding to the enzyme. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 45(6): 511-518.
- Lu J., Tan M. and Cai Q. (2015). The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Letters*. 356(2): 156-164.
- Macheda M. L., Rogers S. and Best J. D. (2005). Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *Journal of Cellular Physiology*. 202(3): 654-662.
- Maldonado M., Rodríguez J. and de Blas I. (2016). El camarón de cultivo frente al WSSV, su principal patógeno. *Revista Científica Internacional de Acuicultura en Español* (21).
- Manimaran M., Rajkumar T., Vimal S., Taju G., Majeed S. A., Hameed A. S. and Kannabiran K. (2018). Antiviral activity of 9 (10H)-Acridanone extracted from marine *Streptomyces fradiae* strain VITMK2 in *Litopenaeus vannamei* infected with white spot syndrome virus. *Aquaculture*. 488: 66-73.
- Martínez-Cruz O., Calderón A. M., Uribe-Carvajal S. and Muhlia-Almazán A. (2012). The function of mitochondrial F<sub>o</sub>F<sub>1</sub> ATP-synthase from the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* muscle during hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology*. 162(4): 107-112.
- Martínez-Cruz O., Chimeo-Núñez C., Rodríguez-Armenta C. M. and Muhlia-Almazán A. (2017). Crustacean Bioenergetics: Mitochondrial Adaptive Molecular Responses to Face Environmental Challenges. *Journal of Shellfish Research*. 36(3): 771-786.
- Martínez-Quintana J. A., Valenzuela-Soto E. M., Martínez-Téllez M. A., Peregrino-Uriarte A. B., Gómez-Jiménez S., Kikuta S. and Yepiz-Plascencia G. (2016). Functionality of the white shrimp glucose transporter 1: Expression in *Xenopus* oocytes and gene silencing during hypoxia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 474: 109-115.
- Martínez-Quintana J. A., Kikuta S., Felix-Portillo M., Peregrino-Uriarte A. B. and Yepiz-Plascencia G. (2015). A novel functional glucose transporter in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*-LvGLUT2-is up-regulated during hypoxia in hepatopancreas. *Marine Environmental Research*. 112: 61-67.
- Martínez-Quintana J. A., Peregrino-Uriarte A. B., Gollas-Galván T., Gómez-Jiménez S. and Yepiz-Plascencia G. (2014). The glucose transporter 1-GLUT1-from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* is up-regulated during hypoxia. *Molecular Biology Reports*. 41(12): 7885-7898.

- Mathupala S. P., Ko Y. H. and Pedersen P. L. (2009). Hexokinase-2 bound to mitochondria: cancer's stygian link to the "Warburg Effect" and a pivotal target for effective therapy. *Seminars in Cancer Biology*. 9(1): 17-24.
- Medina-Félix D., López-Elías J. A., Martínez-Córdova L. R., López-Torres M. A., Hernández-López J., Rivas-Vega M. E. and Mendoza-Cano F. (2014). Evaluation of the productive and physiological responses of *Litopenaeus vannamei* infected with WSSV and fed diets enriched with *Dunaliella* sp. *Journal of Invertebrate Pathology*. 117: 9-12.
- Mejías A. V. y Navarro N. P. (2013). El Virus del Síndrome de las Manchas Blancas (WSSV): una revisión y su impacto en la camaronicultura costarricense. *Revista Ciencias Veterinarias*. 28(2): 51-69.
- De-la-Re-Vega E. (2011). Caracterización de la ADN polimerasa del virus de la mancha blanca (WSSV) y la proteína accesoria PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. (Tesis doctoral). Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo A. C., Hermosillo., Sonora, México.
- Mendoza-Cano F. and Sánchez-Paz, A. (2013). Development and validation of a quantitative real-time polymerase chain assay for universal detection of the White Spot Syndrome Virus in marine crustaceans. *Virology Journal*. 10: 186.
- Miranda-Cruz M. M., Poom-Llamas J. J., Godoy-Lugo J. A., Ortiz R. M., Gómez-Jiménez S., Rosas-Rodríguez J. A., Morán-Palacio E. F. and Soñánez-Organis J. G. (2018). Silencing of HIF-1 in WSSV-infected white shrimp: Effect on viral load and antioxidant enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 213: 19-26.
- Pan J. C., Yu Z., Su X. Y., Sun Y. Q., Rao X. M. and Zhou H. M. (2004). Unassisted refolding of urea-denatured arginine kinase from shrimp *Fenneropenaeus chinensis*: Evidence for two equilibrium intermediates in the refolding pathway. *Protein Science*. 13(7): 1892-1901.
- Pelicano H., Martin D., Xu R. and Huang, P. (2006). Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene*. 25: 4633-4646.
- Perazzolo L. M., Gargioni R., Ogliari P. and Barracco M. A. (2002). Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture*. 214(1-4): 19-33.
- Pérez A. H. (2012). Dinámica de infección del virus del Síndrome de la mancha blanca (WSSV), en hemocitos de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). (Tesis de maestría). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, CIBNOR S.C., La Paz, B.C.S., México.
- Puente-Carreón E. (2009). Respuestas fisiológicas de juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, a condiciones oscilantes de oxígeno disuelto y temperatura. (Tesis de doctorado). Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz, B.C.S., México.
- Qiu R., Cheng Y., Huang X., Wu X., Yang X. and Tong, R. (2011). Effect of hypoxia on immunological, physiological response, and hepatopancreatic metabolism of juvenile Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Aquaculture International*. 19(2): 283-299.
- Ramos-Carreño S. (2010). Mecanismos de infección del virus de la mancha blanca (WSSV) en

camarón *Litopenaeus vannamei* expuesto a salinidades extremas (Tesis de maestría). Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, B.C.S., México.

- Rao V., Ivanov J., Weisel R. D., Cohen G., Borger M. A. and Mickle D. A. (2001). Lactate release during reperfusion predicts low cardiac output syndrome after coronary bypass surgery. *The Annals of Thoracic Surgery*. 71(6): 1925-1930.
- Rao R., Bhasu S., Bing R. Z., Alinejad T., Hassan S. S. and Wang, J. (2016). A transcriptome study on *Macrobrachium rosenbergii* hepatopancreas experimentally challenged with white spot syndrome virus (WSSV). *Journal of Invertebrate Pathology*. 136: 10-22.
- Re A. D., Díaz F., Sierra E. and Gómez-Jiménez, S. (2004). Consumo de oxígeno, excreción de amonio y capacidad osmorreguladora de *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) expuesto a diferentes combinaciones de temperatura y salinidad. *Ciencias Marinas*. 30(3): 443-453.
- Reyes-Ramos C. A., Peregrino-Uriarte A. B., Cota-Ruiz K., Valenzuela-Soto E. M., Leyva-Carrillo L. and Yepiz-Plascencia G. (2018). Phosphoenolpyruvate carboxykinase cytosolic and mitochondrial isoforms are expressed and active during hypoxia in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology*. 226: 1-9.
- Reyes-Zamora O. (2018). El transportador mitocondrial de calcio: su estructura y función en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* durante una infección viral. (Tesis de maestría). Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo A. C., Hermosillo., Sonora, México.
- Richard D. E., Berra E. and Pouyssegur J. (2000). Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*. 275(35): 26765-26771.
- Rodríguez-Armenta C. M. (2018). Evaluación de la transición de la permeabilidad en mitocondrias aisladas del camarón *Litopenaeus vannamei* expuesto a normoxia, hipoxia y reoxigenación. (Tesis doctoral). Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo A. C., Hermosillo., Sonora, México.
- Rodríguez-Villa A. M. (2015). Cultivo del camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en México. (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México.
- Rosas C., Pascual C., López N. and Sánchez A. (2002). Metabolitos sanguíneos como herramientas para evaluar el estado nutricional de camarones peneidos. *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 3.
- SAGARPA (2018). Camarón, producción en crecimiento. Inforural. Blog de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SAGARPA). Consultado de <https://www.inforural.com.mx/camaron-produccion-en-crecimiento/> y de <https://www.inforural.com.mx/camaron-variedades/>.
- Sánchez-Aragó M., Formentini L., Martínez-Reyes I., García-Bermudez J., Santacatterina F., Sánchez-Cenizo L. and Juarránz, Á. (2013). Expression, regulation and clinical relevance of the ATPase inhibitory factor-1 in human cancers. *Oncogenesis*, 2: e46.
- Sánchez-Paz A. (2010). White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. *Veterinary Research*. 41(6): 34.

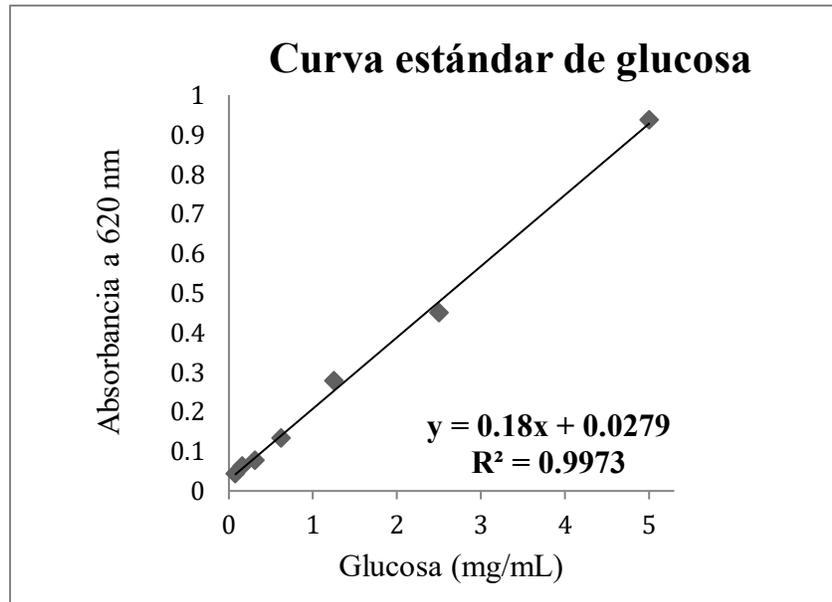
- Sánchez-Paz A., García-Carreño F., Hernández-López J., Muhlia-Almazán A. and Yepiz-Plascencia G. (2007). Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*. 340(2): 184-193.
- Semenza G. L. (2010). HIF-1: Upstream and downstream of cancer metabolism. *Current Opinion in Genetics & Development*. 20(1): 51-56.
- Shafee N., Kaluz S., Ru N. and Stanbridge E. J. (2009). PI3K/Akt activity has variable cell-specific effects on expression of HIF target genes, CA9 and VEGF, in human cancer cell lines. *Cancer Letters*. 282(1): 109-115.
- Schwartz L., T Supuran C. and O Alfarouk K. (2017). The Warburg effect and the hallmarks of cancer. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*. 17(2): 164-170.
- Soñáñez-Organis J. G., Racotta I. S. and Yepiz-Plascencia G. (2010). Silencing of the hypoxia inducible factor-1–HIF-1-obliterates the effects of hypoxia on glucose and lactate concentrations in a tissue-specific manner in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*. 393(1-2): 51-58.
- Stentiford G. D., Chang E. S., Chang S. A. and Neil D. M. (2001). Carbohydrate dynamics and the crustacean hyperglycemic hormone (CHH): effects of parasitic infection in Norway lobsters (*Nephrops norvegicus*). *General & Comparative Endocrinology*. 121(1): 13-22.
- Stentiford G., Neil D., Peeler E., Shields J., Small H., Flegel T. and Moss S. (2012). Disease will limit future food supply from the global crustacean fishery and aquaculture sectors. *Journal of Invertebrate Pathology*. 110(2): 141-157.
- Su M. A., Huang Y. T., Chen I. T., Lee D. Y., Hsieh Y. C., Li C. Y., Ng T. H., Liang S. Y., Lin S. Y., Huang S. W., Chiang Y. A., Yu H. T., Khoo K. H., Chang G. D., Lo C. F., and Wang H. C. (2014). An invertebrate Warburg effect: a shrimp virus achieves successful replication by altering the host metabolome via the PI3K-Akt-mTOR pathway. *PLoS Pathogens*: 10(6): e1004196.
- Tran Q., Lee H., Park J., Kim S.-H. and Park J. (2016). Targeting cancer metabolism-revisiting the Warburg effects. *Toxicological Research*. 32(3): 177.
- Van Handel E. (1985). Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 1(3): 299-301.
- Vargas-Albores F., Guzmán M. A. and Ochoa, J. L. (1993). An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comparative Biochemistry & Physiology Part A: Physiology*. 106(2): 299-303.
- Vázquez A., Liu J., Zhou Y. and Oltvai Z. N. (2010). Catabolic efficiency of aerobic glycolysis: the Warburg effect revisited. *BMC Systems Biology*. 4(1): 58.
- Wang B., Li F., Dong B., Zhang X., Zhang C. and Xiang J. (2006). Discovery of the genes in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA microarray. *Marine Biotechnology* 8(5): 491-500.
- Wang L., Chen H., Xu J., Xu Q., Wang M., Zhao D. and Song L. (2017). Crustacean hyperglycemic hormones directly modulate the immune response of hemocytes in shrimp *Litopenaeus*

*vannamei*. Fish & Shellfish Immunology. 62: 164-174.

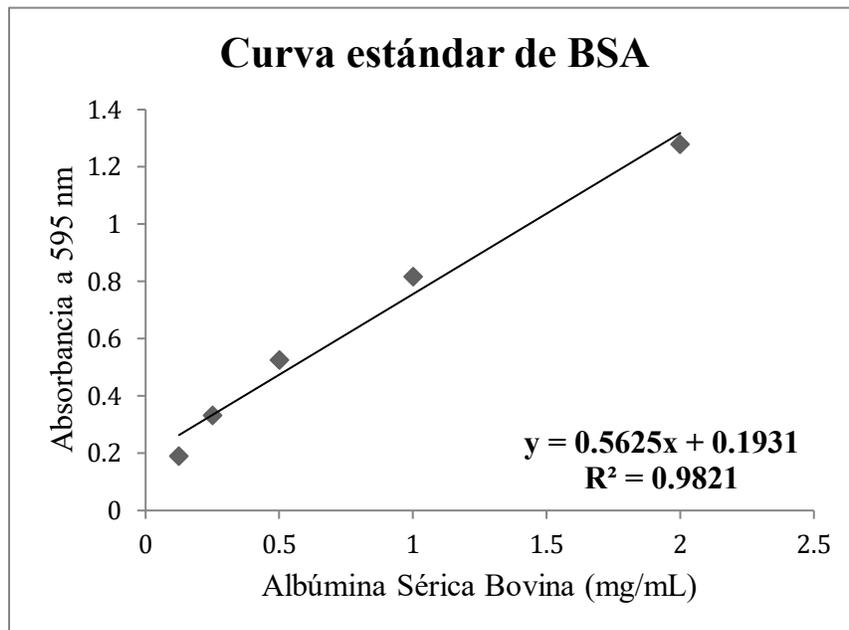
- Wang H. C., He S. T., Lee D. Y., Tung C. Y. and Li C. Y. (2019). Glutamine metabolism in both the oxidative and reductive directions is triggered in shrimp immune cells (hemocytes) at the WSSV genome replication stage to benefit virus replication. *Frontiers in Immunology*. 10: 2102.
- Warburg O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*. 123(3191): 309-314.
- Webster S. G., Keller R. and Dircksen H. (2012). The CHH-superfamily of multifunctional peptide hormones controlling crustacean metabolism, osmoregulation, moulting and reproduction. *General and Comparative Endocrinology*. 175(2): 217-233.
- Wyban J. and Sweeney J. (1993). Intensive shrimp production in round ponds. *CRC Handbook of Mariculture Florida, United States of American*. 275-287 pp.
- Yi G., Wang Z., Qi Y., Yao L., Qian J. and Hu L. (2004). Vp28 of shrimp white spot syndrome virus is involved in the attachment and penetration into shrimp cells. *BMB Reports*. 37(6): 726-734.
- Yu Y., Clippinger A. J. and Alwine J. C. (2011). Viral effects on metabolism: changes in glucose and glutamine utilization during human cytomegalovirus infection. *Trends in Microbiology*. 19(7): 360-367.
- Zamora-Méndez S. (2017). Respuesta metabólica del camarón blanco, *Litopenaeus vannamei* en relación al ciclo de muda y durante el proceso de cosecha en un cultivo semi-intensivo así como su repercusión sobre la calidad postcosecha. (Tesis doctoral). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, CIBNOR S.C., La Paz, B.C.S., México.
- 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.

## 10. ANEXOS

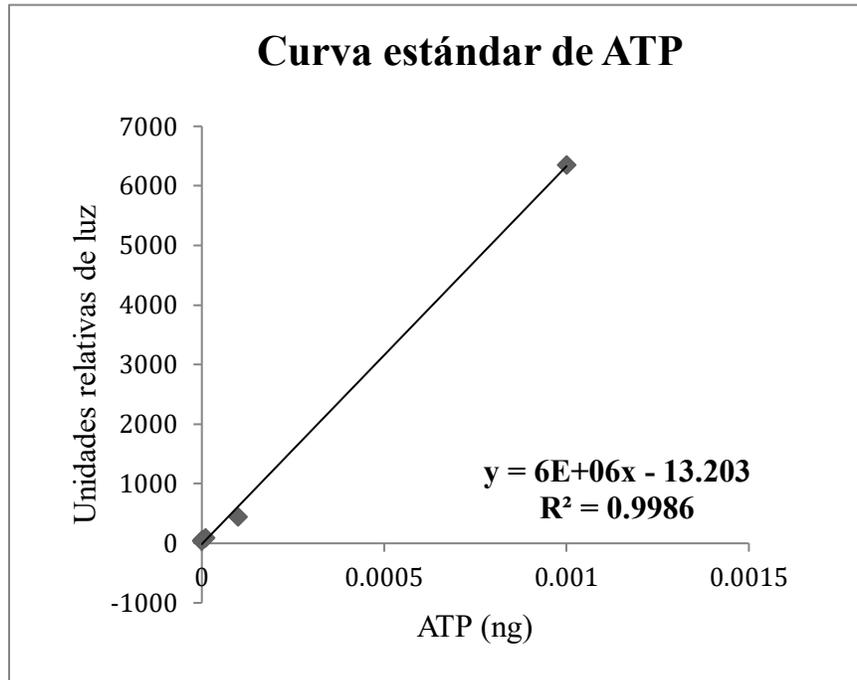
**ANEXO 1:** Curva estándar de glucosa para la cuantificación de glucógeno en la glándula digestiva de *L. vannamei* mediante el método de la antrona.



**ANEXO 2:** Curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) para la cuantificación de las proteínas solubles en la glándula digestiva de *L. vannamei* mediante el método de Bradford.



**ANEXO 3:** Curva estándar de ATP para la determinación de ATP en la glándula digestiva de *L. vannamei* mediante el método de la luciferasa.



**ANEXO 4:** Rango dinámico del gen *lvglut1* en la glándula digestiva de *L. vannamei*.

