



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

**GLUCOSA-6-FOSFATASA Y SU MODULACIÓN BAJO
HIPOXIA Y REOXIGENACIÓN EN EL CAMARÓN BLANCO**

Litopenaeus vannamei

Por:

M.C. Laura Estefany Hernández Aguirre

TESIS APROBADA POR LA

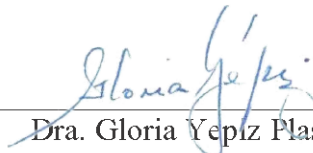
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Laura Estefany Hernández Aguirre, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctora en Ciencias.



Dra. Gloria Yepiz Plascencia
Directora de Tesis



Dra. Elisa Miriam Valenzuela Soto
Integrante del comité de tesis



Dra. Silvia Gómez Jiménez
Integrante del comité de tesis



Dra. Josafat Marina Ezquerro Brauer
Integrante del comité de tesis

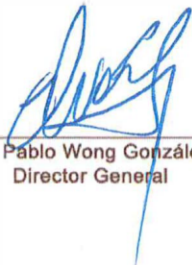
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “La Glucosa-6-fosfatasa y su Modulación Bajo Hipoxia en el Camarón Blanco *Litopenaeus vannamei*” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Laura Estefany Hernández Aguirre, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

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



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



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), por darme la oportunidad de realizar mi tesis doctoral y mi formación académica y profesional en sus instalaciones, así como al personal administrativo y académico por su apoyo durante toda mi estancia en esta institución.

Al proyecto CONACyT de Ciencia Básica A1-S-24557 otorgado a la Dra. Gloria Yepiz, que financió la realización de esta tesis.

Agradezco profundamente a la Dra. Gloria Yepiz Plasencia por haberme aceptado en su grupo de investigación y brindado la oportunidad de aprender de sus enseñanzas, compartiendo su vasto conocimiento. Por su excelente guía y disponibilidad en cualquier momento, por su confianza, tremenda paciencia y gran apoyo, por todos sus consejos profesionales y personales, y por cada uno de los momentos compartidos a lo largo de estos años. De todo corazón, muchas gracias.

A mi comité de tesis las doctoras Eliza Valenzuela, Marina Ezquerro y Silvia Gómez, que con su apoyo, comentarios y recomendaciones ayudaron a que los objetivos planteados en esta tesis se alcanzaran exitosamente. Gracias por tener siempre la disponibilidad de apoyarme.

A la M.C. Alma Peregrino Uriarte, quien fue pilar para que se llevara a cabo la parte experimental en esta tesis. Le agradezco con mucho cariño por compartir su amplio conocimiento, por sus acertados comentarios, sugerencias y sabios consejos, y por sus palabras de aliento sobre todo durante las malas rachas, que no fueron pocas. Siempre le estaré agradecida.

A la M.C. Lilia Leyva por su enorme apoyo técnico. Por asesorarme en el planteamiento de nuevas técnicas, así como en la búsqueda de información relevante. Por los miles de detalles que ella vió y me ayudó a ver en las diferentes técnicas usadas. Por sus consejos y su apoyo en todo momento. Muchas gracias por compartir su tiempo y experiencia. Le agradezco de todo corazón.

A todo el “Equipazo”, especialmente a mis compañeros de laboratorio Paulina, Dalia, Marissa Omar, Dahlia, Ricardo, Jorge y Laura Camacho, por su apoyo y consejos, por los momentos agradables compartidos que hicieron muy amena mi estancia en el doctorado. Muchas gracias por su amistad.

Agradezco enormemente al Laboratorio de Fisiología de Invertebrados Marinos liderado por la

Dra. Silvia Gómez, y nuevamente al “Equipazo” con mención especial a Dalia, Paulina, Marissa y Omar, así como a Gabriel, Adrián y Julio, quienes me apoyaron durante el bioensayo y el muestreo de tejidos del camarón para medir actividad de G6Pasa, justo cuando pasaba por momentos difíciles. Sin su apoyo esta parte experimental no hubiera sido posible. Nunca lo olvidaré.

A mi madre Alma y hermanas Alma y Judith, por su apoyo incondicional, sus palabras de aliento, sus abrazos a distancia y por siempre estar. Las amo.

Le agradezco de todo corazón a Magly García. Por el impulso que me da cada día para seguir avanzando en este sueño. Por creer en mí y apoyarme en cada paso que doy. Por su compañía en los buenos y malos momentos. Gracias infinitas.

DEDICATORIA

Para mi familia: Alma Rosa, Judith, Alma Angélica, Magly García y María Azucena.

Que privilegio estar rodeada de grandes mujeres.

Las amo.

CONTENIDO

APROBACIÓN.....	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE CUADROS.....	10
RESUMEN.....	11
ABSTRACT	13
1. SINOPSIS.....	14
1.1. Justificación	14
1.2. Antecedentes.....	15
1.2.1. <i>Litopenaeus vannamei</i>	15
1.2.2. Estrés Abiótico en el Camarón <i>L. vannamei</i>	17
1.2.2.1. Hipoxia y reoxigenación en el medio acuático	18
1.2.2.2. Hipoxia y reoxigenación en <i>L. vannamei</i>	19
1.2.3. Factor Inducible por Hipoxia 1	21
1.2.3.1. HIF-1 en <i>L. vannamei</i>	22
1.2.4. Metabolismo de la Glucosa en Diferentes Condiciones de Oxigenación en el Camarón <i>L. vannamei</i>	23
1.2.5. Glucosa 6 fosfatasa	27
1.2.6. Isoformas de G6Pasa	29
1.3. Hipótesis	31
1.4. Objetivo General.....	31
1.5. Objetivos Específicos	32
1.6. Sección Integradora	32
2. THE GLUCONEOGENIC GLUCOSE-6-PHOSPHATASE GENE IS EXPRESSED DURING OXYGEN-LIMITED CONDITIONS IN THE WHITE SHRIMP <i>Penaeus</i> (<i>Litopenaeus</i>) <i>vannamei</i>: MOLECULAR CLONING, MEMBRANE PROTEIN MODELING AND TRANSCRIPT MODULATION IN GILLS AND HEPATOPANCREAS	34
3. A SECOND ISOFORM OF PACIFIC WHITE SHRIMP GLUCOSE-6-PHOSPHATASE (G6Pase2). ISOFORMS REGULATION VIA HIF-1 IN HYPOXIA AND REOXYGENATION	48
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	88
4.1. G6Pasa1 del Camarón Blanco del Pacífico	88
4.2. G6Pasa2 del Camarón Blanco del Pacífico	90

CONTENIDO (continuación)

4.3. Actividad y Expresión de la G6Pasa en Normoxia	93
4.4. Regulación de la G6Pasa1 y G6Pasa2 <i>vía</i> HIF-1 en Hepatopáncreas y Branquias bajo Diferentes Condiciones de Oxigenación	95
5. CONCLUSIONES	99
6. RECOMENDACIONES	100
7. BIBLIOGRAFÍA	101

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Diagrama general de las respuestas condición-tejido-tiempo específicas de las enzimas de la glucólisis, glucólisis anaerobia, gluconeogénesis y glucogenólisis en el camarón.....	26
2	Reacción enzimática de la glucosa 6-fosfatasa.....	27
3	Mecanismo de reacción propuesto de la G6Pasa.....	28
4	Esquematización de la complejidad estructural del gen de la G6Pasa2 del camarón blanco <i>L. vannamei</i> según los datos obtenidos del genoma (Zhang et al. 2019).....	91
5	Secuencia promotora putativa de la G6Pasa2	92
6	Expresión relativa de la G6Pasa1 y G6Pasa2 en hepatopáncreas, branquias y músculo de camarones con 24 h de ayuno en normoxia.....	94
7	Representación de las respuestas de expresión de las isoformas de la G6Pasa en el camarón frente al estrés por hipoxia y reoxigenación en diferentes tiempos, mediadas por HIF-1.....	98

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Enzimas y proteínas relacionadas con el estrés por hipoxia y/o reoxigenación, y HIF-1 estudiadas en el camarón blanco <i>L. vannamei</i>	24

RESUMEN

Los crustáceos comúnmente se enfrentan a diversos factores bióticos y abióticos estresantes. En los últimos años, los ciclos de desoxigenación/reoxigenación en los cuerpos de agua son estudiados debido al calentamiento global, ya que aumentan las zonas muertas (de hipoxia/anoxia) en las costas. Comprender cómo estos organismos mantienen la homeostasis energética para sobrevivir es crucial para conocer su regulación metabólica bajo estrés. El camarón *Litopenaeus vannamei* induce la glucólisis anaeróbica y modula la expresión de las enzimas de la gluconeogénesis de forma condición-tejido-específica para satisfacer sus necesidades energéticas durante la hipoxia. La glucosa 6-fosfatasa (G6Pasa) es una enzima clave para mantener la homeostasis de la glucosa en sangre durante el último paso de la gluconeogénesis y la glucogenólisis; sin embargo, la interacción de estas dos vías no es del todo clara en los crustáceos. En este trabajo se reporta la caracterización molecular de dos isoformas de la G6Pasa de *L. vannamei* y su regulación vía el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) en estrés por hipoxia y reoxigenación. Se obtuvieron y caracterizaron las secuencias nucleotídicas codificantes completas de las dos isoformas. Las secuencias de aminoácidos tienen ~35% de identidad con otras proteínas homólogas, los aminoácidos catalíticos están totalmente conservados y ambas son filogenéticamente cercanas a las correspondientes homólogas de invertebrados. Las dos isoformas se denominaron G6Pasa1 y G6Pasa2. El modelado molecular muestra una topología transmembranal con 7 y 8 hélices respectivamente, con los sitios catalíticos orientados hacia el lumen del retículo endoplásmico. La expresión por RT-qPCR mostró que la G6Pasa1 se expresa mayormente en hepatopáncreas, con niveles similares en branquias y músculo, mientras que la G6Pasa2 solo se expresa en hepatopáncreas cuando los animales se encuentran en 24 h de ayuno en normoxia. En animales con 2 h de ayuno, la actividad G6Pasa está presente en los tres tejidos siendo mayor en hepatopáncreas, indicando la importancia de este órgano en la homeostasis de la glucosa en normoxia. El silenciamiento de HIF-1 demostró que la G6Pasa1 disminuye en hipoxia, pero se induce durante la reoxigenación a las 3 h en branquias, aunque la G6Pasa2 disminuye en ambas condiciones en el mismo tiempo, así como en reoxigenación a las 48 h pero solo en hepatopáncreas, demostrando que HIF-1 participa en la regulación de ambas isoformas de una forma tejido-tiempo y condición específica.

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, hipoxia/reoxigenación, glucosa 6-fosfatasa, homeostasis de la glucosa.

ABSTRACT

Crustaceans face environmental challenges due to biotic and abiotic factors, both in their habitat and in farming systems. The deoxygenation/reoxygenation cycles are studied in recent years due to global warming that increases the appearance of death zones on the coasts. Thus, understanding how these organisms maintain energy homeostasis is crucial to understand metabolic regulation under stress. The shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to oxygen-limited conditions induces anaerobic glycolysis and modulates the expression of gluconeogenesis enzymes in a tissue- and condition-specific manners to satisfy their energy requirements. Glucose 6-phosphatase (G6Pase) is a key enzyme to maintain blood glucose homeostasis through the last step of gluconeogenesis and glycogenolysis; however, the interplay of these two pathways is not fully elucidated in crustaceans. Herein we report the molecular characterization of two G6Pase isoforms from *L. vannamei*, and their regulation via the hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia and reoxygenation stresses. The two genes coding nucleotide sequences were obtained and characterized. The amino acid sequences have ~35% identity to homolog proteins, with the catalytic amino acids conserved and are phylogenetically close to the corresponding invertebrate homologs. The two isoforms were named G6Pase1 and G6Pase2. Protein molecular modeling depicts transmembrane proteins with 7 and 8 helices respectively, and the catalytic sites towards the lumen of the endoplasmic reticulum. Expression by RT-qPCR demonstrated that both G6Pases isoforms are tissue-specific expressed; G6Pase1 is higher in hepatopancreas, and with similar levels in gills and muscle, while G6Pase2 is only expressed in hepatopancreas in 24 h fasted animals in normoxia. In 2 h fasted animals, G6Pase activity was detected in the three tissues evaluated, but with higher abundance in hepatopancreas, indicating the importance of this organ on glucose homeostasis in normoxia. After HIF-1 knock-down, G6Pase1 is down-regulated in hypoxia but induced in reoxygenation at 3 h of exposure in gills, although G6Pase2 is down-regulated in both conditions at the same time as in reoxygenation at 48 h but only in hepatopancreas, demonstrating that this transcription factor regulates both isoforms in a condition, time, and tissue-specific manner.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, hypoxia/reoxygenation, glucose 6-phosphatase, glucose homeostasis.

1. SINOPSIS

1.1. Justificación

Una de las principales especies marinas de interés económico para México y para el mundo es el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*, un crustáceo que se produce principalmente por acuicultura (FAO 2022). Este organismo ocupa el primer y segundo lugar en importancia económica en el país por su valor comercial y por el volumen de producción pesquera respectivamente. De acuerdo con el anuario estadístico de acuicultura y pesca, la tasa media de crecimiento anual en la producción de camarón fue de 4.38% en los últimos 10 años con más de 270 mil toneladas producidas en 2020, siendo Sinaloa y Sonora los principales estados productores (CONAPESCA, 2022).

Aunado a la alta demanda del camarón en el mundo, parte del éxito de producción de este crustáceo se debe a que es relativamente tolerante a diversas condiciones ambientales. *L. vannamei* sobrevive en un amplio rango de salinidad (Chong-Robles *et al.*, 2014; Pinem y Sarida, 2022), temperatura (Hernández *et al.*, 2006; Ponce-Palafox *et al.*, 2019), oxígeno (Pérez-Rostro *et al.*, 2004; Rosas *et al.*, 1999; Wannamaker y Rice, 2000), entre otros factores abióticos. Pese a ello, la producción de camarón se ha visto afectada en los últimos años por la acentuación de dichas condiciones que generan incluso un efecto sinérgico sobre las funciones fisiológicas del organismo, y que son ocasionadas principalmente por el cambio climático y la intensificación de la industria acuícola (Estrada-Cárdenas *et al.*, 2021).

En ese sentido, uno de los fenómenos más importantes que ocurren en el océano, la desoxigenación de las aguas costeras, se ha agravado por el aumento de las temperaturas, los niveles de CO₂ y los aportes de nutrientes provenientes de la actividad humana, lo que genera eventos de hipoxia/reoxigenación, fuertes estresores ambientales que se prevé aumentarán en los próximos años gracias al calentamiento global, alterando la abundancia y distribución de las especies marinas (Breitburg *et al.*, 2018; Stramma y Schmidtke, 2019).

Tanto la baja concentración de oxígeno como su rápido restablecimiento tienen efecto en la fisiología y el comportamiento de los crustáceos como la aparición de estrés oxidativo y la

inducción de enzimas antioxidantes (Hermes-Lima *et al.*, 2015; Parrilla-Taylor y Zenteno-Savín, 2011), o la alteración del metabolismo energético (Chang y Thiel, 2015; Soñanez-Organis *et al.*, 2010), que les permite adaptarse para sobrevivir a estas condiciones. Por ejemplo, el camarón al ser un organismo oxiregulador (Rosas *et al.*, 1999), recurre a la glucólisis anaerobia y a la gluconeogénesis como una forma de satisfacer sus requerimientos energéticos, lo que le permite desarrollar una estrategia fisiológica y bioquímica diferente dependiendo del grado y tiempo de exposición a hipoxia y reoxigenación. Esto ha dado pie al estudio específico de las enzimas involucradas, para tratar de dilucidar el complejo mecanismo que le permite al organismo lidiar y adaptarse a dichas variaciones (Soñanez-Organis *et al.* 2011, 2012; Cota-Ruiz *et al.* 2015, 2016; Reyes-Ramos *et al.* 2018; Camacho-Jiménez *et al.* 2019; Hernández-Aguirre *et al.* 2021; Granillo-Luna *et al.* 2022).

La glucosa 6-fosfatasa es una enzima que participa en la gluconeogénesis y la glucogenólisis, clave en el metabolismo energético de los seres vivos para la homeostasis de glucosa, cuya regulación está estrechamente relacionada con los factores estresantes que involucran la demanda de energía tanto inmediata como a largo plazo (Hah *et al.*, 2002; Trandaburu, 1977; van Schaftingen y Gerin, 2002). En crustáceos, la información referente a esta enzima es escasa, por lo que existe la necesidad de su estudio para entender mejor los mecanismos bioquímicos y fisiológicos que tienen lugar frente a los principales estresores ambientales a los que se enfrentan en su hábitat y en los cultivos.

1.2. Antecedentes

1.2.1. *Litopenaeus vannamei*

Litopenaeus vannamei (Boone, 1931) también conocido como camarón blanco del Pacífico, es un crustáceo decápodo nativo de la costa del Pacífico, que habita desde el norte de México en Sonora, hasta Perú en Sudamérica. Este animal tiene un cuerpo compuesto por un cefalotórax y un abdomen. En el cefalotórax se ubican la cabeza, las branquias, pedúnculos oculares, anténulas,

antenas, mandíbulas y varios órganos vitales incluyendo el hepatopáncreas, un tórax con tres pares de maxilípedos y cinco pares de pereiópodos. El abdomen consta de seis segmentos, los primeros cinco con pleópodos y el sexto finalizando con una estructura puntiaguda conocida como telson. Los camarones son organismos dioicos de fecundación externa, los adultos viven en ambientes marinos tropicales mientras que las post-larvas pasan su etapa juvenil y pre adulta en estuarios y lagunas costeras, su alimentación está dada durante la fase larvaria de plancton y durante la fase juvenil, es detritívoro bentónico (INAPESCA, 2018).

El cultivo de camarón se da por diferentes fases iniciando con la maduración de los reproductores que pueden ser silvestres, cultivados, también hay domesticados que son producto de programas de cría selectiva para obtener líneas resistentes a patógenos y que se mantienen en estanques de maduración con control de luz, calidad de agua y alimento. Para el cultivo de camarón ya existen laboratorios reproductores en donde las hembras desovan y los nauplios sanos son capturados y desinfectados para pasar a la fase de incubación. En ésta última fase los organismos se mantienen en tanques planos donde se crían por aproximadamente 21 días (dependiendo del destino de las postlarvas) bajo buenas prácticas de manejo para reducir contaminación bacteriana/patógena, y favorecer el desarrollo óptimo. Luego las postlarvas son mantenidas de 1 a 5 semanas en tanques de producción hasta que comienza la fase de engorda que puede ser extensiva, semi-intensiva, intensiva o super intensiva con rendimientos y densidades de cultivo que varían dependiendo de la capacidad tecnológica de las granjas (FAO 2022).

El camarón blanco vive en un variado rango de temperatura que va desde 20 a 35 °C, (Hernández *et al.*, 2006; Ponce-Palafox *et al.*, 2019), salinidad con concentraciones entre 5 y 40 ups (Chong-Robles *et al.* 2014; FAO 2022; Pinem y Sarida 2022) y oxígeno disuelto desde 4 a 10 mg/L (INAPESCA, 2018; Pérez-Rostro *et al.*, 2004; Rosas *et al.*, 1999). Esta amplia capacidad de sobrevivencia aunada al fácil manejo y alta tasa de crecimiento en comparación con otros crustáceos, es lo que lo hace económicamente redituable. *L. vannamei* es la especie más popular para cultivo en el hemisferio occidental representando el 95% de la producción mundial y es la principal especie cultivada en México (FAO, 2022). Datos de la SAGARPA muestran que la producción de camarón aumentó en un 65.5% en los últimos años, donde México es el 7° productor a nivel mundial generando 270 mil 807 toneladas en 2020 (CONAPESCA, 2022).

Pese al éxito que ha tenido el cultivo del camarón en todo el mundo, existen muchos factores que pueden afectar negativamente su producción, entre los que destacan los factores abióticos como las

temperaturas extremas, el bajo nivel de oxígeno disuelto y su rápido restablecimiento, concentraciones altas y bajas de sales, el tipo de alimento, el tipo de cultivo, cambios en el pH, etc., que comprometen la supervivencia y desarrollo óptimo del organismo y que son el resultado del cambio climático y la intensificación de la industria camaronera (Chang y Thiel, 2015; Gaxiola *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2018; Sánchez-Paz *et al.*, 2007).

La importancia económica y social de este recurso en México y en el mundo, ha propiciado investigaciones en diferentes campos de la ciencia, para promover la diversificación y tecnificación de cultivos. Se ha trabajado en términos básicos y aplicados sobre sanidad, nutrición, bioquímica, expresión genética, desarrollo de líneas genéticas resistentes a enfermedades, impacto en el medio ambiente, y otras problemáticas cuyo estudio está siendo impulsado por el gobierno de México para generar conocimiento que pueda fortalecer y consolidar este sector (INAPESCA, 2018).

1.2.2. Estrés Abiótico en el Camarón *L. vannamei*

Predominantemente, los cultivos de camarón se realizan en sistemas de alta densidad en estanques cerrados, con bajo control de calidad de agua. Por otro lado, el camarón en su hábitat natural, también está expuesto a cambios de las variables ambientales debido a procesos naturales o antropogénicos. En este sentido, la constante fluctuación de los factores abióticos como la temperatura del agua, la salinidad, oxigenación, pH, entre otros, aumenta la susceptibilidad de los camarones a enfermarse y/o morir, por lo que son particularmente importantes para asegurar la calidad del agua y por ende, la buena salud del animal (Millard *et al.*, 2021).

El nivel de estrés se podría definir de acuerdo con una escala temporal en agudo y crónico. El primero caracterizado por un evento puntual con respuestas rápidas del tipo metabólico y hormonal, seguido de una recuperación casi inmediata de los niveles basales. Por otra parte, el estrés crónico ocurre debido a periodos de mayor duración relacionados casi siempre al ambiente en el que los organismos se encuentran, acompañado de respuestas del mismo tipo (metabólicas y hormonales), pero en este caso con una recuperación que tiende a ser más lenta (Zacarías-Soto, 1997). Por su parte el estrés abiótico se define como el impacto negativo de los factores ambientales sobre los organismos vivos en un entorno específico. Y aunque el camarón es relativamente tolerante a

diversas condiciones ambientales extremas, esta tolerancia desata un conjunto de respuestas fisiológicas y moleculares que reflejan el nivel de estrés al que el organismo está sometido como una reacción al desvío de su homeostasis (Chang y Thiel, 2015).

Por ejemplo, salinidades por debajo de 4 ppt afectan negativamente tanto la supervivencia como el crecimiento de postlarvas (Laramore *et al.*, 2001) y en condiciones hipersalinas (60 ppt) camarones en fase adulta sufren estrés salino aumentando los porcentajes de mortalidad (Chong-Robles *et al.*, 2014). Además, durante su adaptación, el camarón aumenta su ingesta de alimento para mantener la homeostasis energética demandada por las condiciones de estrés (Rosas *et al.*, 2001).

El porcentaje de supervivencia y el crecimiento también se ven afectados con la exposición a temperaturas estresantes ($< 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $> 34\text{ }^{\circ}\text{C}$) dado que el camarón es un organismo ectotermo, y especialmente con el efecto combinado de otros factores como la salinidad o el oxígeno disuelto, lo que indica un cambio aparente en la actividad metabólica (Arzola G *et al.*, 2013; Ponce-Palafox *et al.*, 1997, 2019). También se ha estudiado el efecto del pH y el oxígeno disuelto (OD), siendo este último una variable relevante de investigación actual en consecuencia al cambio climático debido a las actividades humanas (Breitburg *et al.*, 2018).

1.2.2.1. Hipoxia y reoxigenación en el medio acuático. El oxígeno disuelto es una variable ambiental de los ecosistemas acuáticos que cambia drástica y constantemente. En las últimas décadas la concentración del oxígeno en las aguas costeras y marinas ha disminuido considerablemente, y la ocurrencia de este fenómeno ha aumentado tanto de forma espacial como temporal, siendo cada vez más común en todo el mundo (EEA, 2022). La hipoxia, puede presentarse debido a la combinación de causas naturales, como el aumento en la temperatura en los meses verano-otoño, y antropogénicas principalmente por el aumento en la cantidad de materia orgánica proveniente de las actividades humanas, que desembocan en los cuerpos de agua y que generan desoxigenación (eutrofización), lo que podría inducir el colapso de muchos ecosistemas (Diaz, 2001; Hernández-Aguirre *et al.*, 2021). El momento en el que los organismos comienzan a sufrir hipoxia varía entre especies, pero generalmente los efectos comienzan a aparecer cuando la concentración de oxígeno está por debajo de los 2 mg/L (Diaz, 2001), sin embargo, todos los organismos poseen mecanismos para mantener la homeostasis del oxígeno con el objetivo de sobrevivir.

En estado de hipoxia, cuando el consumo de oxígeno es mayor al suministro, se genera una respuesta fisiológica que aumenta la capacidad de la sangre para transportar oxígeno a los tejidos alterando el metabolismo celular, como una estrategia para facilitar la producción de ATP mediante la glucólisis anaerobia (Li y Brouwer, 2007). Es decir, cuando las concentraciones de oxígeno varían en los cuerpos de agua donde los organismos habitan, su metabolismo se altera, y esto a su vez se refleja en su desarrollo, cuya resistencia depende de la capacidad adaptativa de las especies. Los crustáceos fueron descritos como el grupo de organismos más sensibles a las concentraciones de oxígeno comparados con moluscos y cnidarios (Vaquer-Sunyer y Duarte, 2008), sin embargo, se sabe que algunos de ellos pueden sobrevivir aún en condiciones hipóxicas extremas.

Asimismo, la reoxigenación es el fenómeno que sucede a un evento de hipoxia/anoxia y se caracteriza por la recuperación súbita o prolongada de los niveles normales de oxígeno, es decir, el restablecimiento de la normoxia. En los océanos, los eventos de hipoxia/reoxigenación tienen lugar por la combinación de los factores abióticos antes mencionados aunados al consumo de oxígeno de los organismos que ahí habitan, con su suministro durante el movimiento y mezcla de las columnas de agua (EEA, 2022).

Se ha demostrado que la hipoxia y reoxigenación generan diversas respuestas fisiológicas y moleculares especie-específicas, como el aumento en las especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden causar daño celular, por lo que se desencadena una protección antioxidante que previene el estrés oxidativo (Giraud-Billoud *et al.*, 2019; Hermes-Lima y Zenteno-Savín, 2002). En el camarón la defensa ocurre de manera tejida específica por medio de la función de enzimas y proteínas a través de complejas respuestas y mecanismos (Duarte-Gutiérrez *et al.*, 2021; Estrada-Cárdenas *et al.*, 2021; García-Triana *et al.*, 2016; González-Ruiz *et al.*, 2020).

1.2.2.2. Hipoxia y reoxigenación en *L. vannamei*. *L. vannamei* tiene la capacidad de resistir altos niveles de hipoxia, sin embargo, aún no se han estudiado en detalle los procesos metabólicos que se lo permiten (Nuñez-Hernandez *et al.*, 2018). Se han llevado a cabo diferentes estudios respecto a los cambios que ocurren en el metabolismo del camarón y el impacto en su fisiología. Entre ellos, la influencia de la hipoxia sobre la modulación de la expresión de genes involucrados en la respuesta antioxidante y metabolismo de los carbohidratos, el efecto de la restitución a los niveles normales de oxígeno después de un evento de hipoxia de intensidad y duración variable, así como

también el efecto de la combinación de ambos estresores (Estrada-Cárdenas *et al.*, 2021; Pascual *et al.*, 2003; Rosas *et al.*, 2000; Ulaje *et al.*, 2019). Esta especie es capaz de sobrevivir en ambientes de hasta 0.2 mg/L de oxígeno disuelto por periodos cortos, situación encontrada no solo en su hábitat natural sino también en las zonas de cultivo (Pérez-Rostro *et al.*, 2004),

Se han analizado diferentes enzimas en relación con el mantenimiento celular del equilibrio redox en el camarón. La expresión relativa de la superóxido dismutasa manganesa citosólica (cMnSOD) en hepatopáncreas y branquias se reduce durante la hipoxia (6 h) y aumenta durante la reoxigenación, coincidiendo con el aumento de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD). Esto sugiere que la cMnSOD contribuye significativamente a la actividad total de SODs e indica su importancia en la regulación del sistema redox en *L. vannamei* (García-Triana *et al.*, 2010). Por su parte, un estudio de medición de transcritos en hepatopáncreas del camarón, mostró que la expresión de genes de las proteínas cMnSOD, glutatión peroxidasa (GPX) y la metionina sulfóxido reductasa (MsrB) aumenta con el estrés (después de 4 h de hipoxia), pero se normaliza a las 6 h (Kniffin *et al.*, 2014). La catalasa en branquias, por su parte, aumenta su expresión en hipoxia de 6 y 24 h y aumenta aún más durante la reoxigenación, mientras que su actividad tiene un comportamiento contrario siendo mayor en reoxigenación (Trasviña-Arenas *et al.*, 2013). Ello indica que el camarón bajo diferentes niveles de hipoxia, se encuentra vulnerable a las ROS generando una respuesta variable en la expresión de enzimas antioxidantes, que es además dependiente del tejido. En un estudio del efecto combinado de las variables estresoras de alta temperatura, hipoxia y reoxigenación (en representación a lo que ocurre normalmente en la naturaleza), sobre la primera línea de defensa antioxidante en el camarón, se identificaron una serie de respuestas complejas principalmente tejido-específicas. Esto mostró que el hepatopáncreas es altamente sensible a cambios en el nivel de oxígeno y temperatura, mientras que las branquias son un órgano resiliente debido a su rápida capacidad adaptativa (Estrada-Cárdenas *et al.*, 2021).

La selenoproteína M (SelM) es una enzima con actividad redox involucrada en la respuesta antioxidante, y parece ser clave en la regulación del estrés oxidativo en branquias de camarón (García-Triana *et al.*, 2016). Los efectos de las ROS provocadas por la hipoxia en mamíferos son controlados, en parte, por la acción de las metalotioneínas (MT). En *L. vannamei* aumenta la expresión de MT en periodos prolongados y cortos de hipoxia en hemocitos y hepatopáncreas respectivamente, posiblemente actuando en los procesos de desintoxicación de ROS en los organismos acuáticos (Felix-Portillo *et al.*, 2016, 2014). Además, la MT podría ser regulada

positivamente en diferentes tiempos de hipoxia, por el factor de transcripción HIF-1 en hemocitos y branquias (Duarte-Gutiérrez *et al.*, 2021). De igual manera, se ha reportado que disminuye la actividad de la enzima mitocondrial citocromo c oxidasa (COX), enzima involucrada en la reducción del oxígeno en la cadena transportadora de electrones. La actividad de COX es baja en condición de hipoxia, pero se reestablece gradualmente conforme la hipoxia continúa. Esto permite inferir que dicha proteína posiblemente ayuda a la readaptación de la mitocondria (Jimenez-Gutierrez *et al.*, 2014).

1.2.3. Factor Inducible por Hipoxia 1

El factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) es un factor de transcripción que regula una amplia variedad de respuestas moleculares durante la hipoxia. HIF-1 es un heterodímero de las proteínas HIF-1 α y HIF-1 β , que incluyen los dominios hélice lazo hélice (HLH) y Per ARNT Sim (PAS) responsables de la unión al DNA y de la interacción proteína/proteína. HIF-1 reconoce las secuencias consenso 5'-G/ACGTG-3' en las regiones promotoras denominadas elementos de respuesta a hipoxia o HREs (hypoxia-responsive elements) de los genes que modula (Semenza, 2007). Este factor de transcripción se regula principalmente a través de la subunidad HIF-1 α , ya que la subunidad HIF-1 β se expresa constitutivamente independientemente del oxígeno disponible. El mecanismo de regulación descrito en mamíferos señala que la proteína HIF-1 α se transcribe y sintetiza de forma constitutiva en hipoxia, pero en normoxia se degrada rápidamente, con un tiempo de vida medio de aproximadamente 5 min. Mediante la hidroxilación de dos residuos de prolina y la acetilación de un residuo de lisina en el dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODDD), HIF-1 α es reconocido por el complejo de ubiquitinación E3 para su marcaje y posterior degradación en el proteosoma (26S). Además, se realiza otra hidroxilación en el residuo asparagina del dominio C-terminal de transactivación (C-TAD) responsable de la estimulación de la transcripción, con lo que se inhibe su actividad transcripcional. En hipoxia HIF-1 α se encuentra estable y se puede translocar al núcleo donde se dimeriza con HIF-1 β para formar el complejo HIF-1 transcripcionalmente activo (Ke y Costa, 2006; Semenza, 2007).

HIF-1 es conocido como el regulador maestro de la homeostasis de oxígeno. Dentro de las proteínas

reguladas por HIF-1 se destacan las que intervienen en el metabolismo de la glucosa, y por lo tanto, se han relacionado con patologías glucémicas, cánceres y enfermedades neurodegenerativas en humanos (Nakaoka *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2014). En crustáceos HIF-1 actúa como protector durante la condición de hipoxia y está relacionado con su ciclo circadiano (Fanjul-Moles, 2013). En el langostino *Macrobrachium nipponense*, las proteínas lactato deshidrogenasa (LDH) y hexoquinasa (HK), son dependientes de HIF-1 cuando disminuye la concentración de oxígeno (Sun *et al.*, 2018, 2017). También se conoce que HIF-1 funciona como protector de células neuronales mejorando la capacidad adaptativa a hipoxia en el cangrejo *Eriocheir japonica*. En *Oratosquilla oratoria*, HIF-1 α podría funcionar como biomarcador de exposición a hipoxia ambiental (Kodama *et al.*, 2012). Por otra parte, en la pulga de agua *Daphnia magna*, regula la expresión de los genes de la globina y está relacionado con el cambio de color a rojo visible cuando el organismo se encuentra desprovisto de oxígeno (Gorr *et al.*, 2004). HIF-1 también se induce por estrés térmico y en respuesta a las especies reactivas de oxígeno (Klumpen *et al.*, 2017).

1.2.3.1. HIF-1 en *L. vannamei*. En el camarón blanco se han identificado las subunidades α y β de HIF-1 y se han estudiado los patrones de expresión en diferentes tejidos y condiciones. Se ha encontrado que la cantidad de transcritos de ambas subunidades en hepatopáncreas no cambia de forma significativa bajo normoxia e hipoxia, mientras que en músculo, branquias y hemocitos la expresión entre las subunidades, tejidos evaluados y concentración de oxígeno disuelto varía (Camacho-Jiménez *et al.*, 2019; Duarte-Gutiérrez *et al.*, 2021; Soñanez-Organis *et al.*, 2009). Esto sugiere que dicha proteína podría regular genes clave en diferentes órganos del camarón, influyendo en la detección inicial de hipoxia desencadenando las reacciones de regulación necesarias para adaptarse, o activando rutas glucolíticas y gluconeogénicas para satisfacer la demanda energética requerida y en algunos casos, HIF-1 podría expresarse como gen constitutivo. Los camarones basan el metabolismo de la glucólisis anaerobia en la expresión diferencial de las subunidades LDH-1 y LDH-2 en hipoxia. La expresión de LDH aumenta 2 veces en branquias por efecto de la hipoxia, pero el silenciamiento de HIF-1 bloquea dicha inducción, lo que indica que LDH es regulada transcripcionalmente vía HIF-1 en el camarón (Soñanez-Organis *et al.*, 2012). Por otro lado, cuando el organismo está siendo atacado por un agente infeccioso, como en el caso del virus de la mancha blanca (WSSV), HIF-1 también regula la expresión de algunos genes

involucrados en el metabolismo de la glucosa (Godoy-Lugo *et al.*, 2019; Hernández-Palomares *et al.*, 2018; Soñanez-Organis *et al.*, 2012).

Además, HIF-1 participa en la respuesta antioxidante mediante la inducción de la expresión de la metalotioneína (como se mencionó anteriormente), y cuya regulación también parece estar dada de manera tejida específica (Duarte-Gutiérrez *et al.*, 2021). Esta información indica que la modulación de múltiples mecanismos celulares en el camarón, se lleva a cabo gracias a la intervención de HIF-1, tal y como ocurre en los organismos vertebrados. Incluso existe alto grado de identidad entre las secuencias de aminoácidos de HIF-1 de este organismo en comparación con las de otros vertebrados de diferentes filos (Soñanez-Organis *et al.*, 2009).

1.2.4. Metabolismo de la Glucosa en Diferentes Condiciones de Oxigenación en el Camarón *L. vannamei*

Los organismos bajo condiciones normales de oxígeno (normoxia), utilizan principalmente la fosforilación oxidativa para la obtención de energía, pero cuando se encuentran en hipoxia, se inactiva la cadena transportadora de electrones por la falta de oxígeno y se activa la glucólisis anaerobia. De esta forma, cuando las concentraciones de oxígeno varían, el metabolismo energético es fuertemente regulado por diferentes rutas a nivel transcripcional y postraducciona

En ambientes donde la concentración de oxígeno es escasa, los crustáceos y específicamente el camarón, también utilizan el metabolismo anaeróbico para obtener energía (Soñanez-Organis *et al.*, 2010), y existe evidencia de la modulación de diferentes enzimas de otras rutas relacionadas en respuesta a este estresor. Algunas de estas enzimas ya se han caracterizado y estudiado en el camarón, y en su mayoría se han asociado con una respuesta fisiológica a la falta de oxígeno e incluso a su restitución, donde se destaca el papel de HIF-1 en su regulación (Cuadro 1).

Cuadro 1. Enzimas y proteínas relacionadas con el estrés por hipoxia y/o reoxigenación, y HIF-1 estudiadas en el camarón blanco *L. vannamei*

Gen o proteína	Implicación en el camarón	Referencia
GLUT1	Expresión tejido-específica regulada en hipoxia (1.5 mg/L de OD). Existen isoformas.	(Martínez-Quintana <i>et al.</i> , 2015, 2014)
HK	Expresión tejido-específica regulada en hipoxia (1 y 1.5 mg/L de OD) y reoxigenación <i>vía</i> HIF-1. Existen isoformas y variantes de transcrito.	(Soñanez-Organis <i>et al.</i> 2011); (Flores-Sauceda, 2022)
PFK	Regulación condición y tiempo-específica en hipoxia (1.5 mg/L de OD) en hepatopáncreas <i>vía</i> HIF-1.	(Cota-Ruiz <i>et al.</i> , 2015, 2016)
GAPDH	Expresión tejido-específica regulada en hipoxia (1.5 mg/L de OD) y reoxigenación <i>vía</i> HIF-1.	(Camacho-Jiménez <i>et al.</i> , 2019, 2018)
PK	Expresión tejido-específica regulada en hipoxia (1.5 mg/L de OD) y durante la infección por WSSV <i>vía</i> HIF-1. Hay evidencia de la presencia de isoformas y variantes de transcrito.	(Cruz-Moreno y Yepiz-Plascencia, datos no publicados; Godoy-Lugo <i>et al.</i> , 2019)
LDH	Expresión tejido-específica regulada en hipoxia (1.5 mg/L de OD) <i>vía</i> HIF-1. Se generan dos isoformas por splicing alternativo.	(Soñanez-Organis <i>et al.</i> , 2012)
PC	Expresión tejido específica inducida en hipoxia de corto plazo (1.5 mg/L de OD) en hepatopáncreas.	(Granillo-Luna <i>et al.</i> , 2022)
PEPCK	Expresión regulada en hipoxia (1.5 mg/L de OD) en hepatopáncreas. Existen dos isoformas (PEPCK-M PEPCK-C) en el camarón.	(Reyes-Ramos <i>et al.</i> , 2018)
FBP	Expresión tejido específica con inducción por hipoxia a largo plazo (1.5 mg/L de OD) <i>vía</i> HIF-1.	(Cota-Ruiz <i>et al.</i> , 2015, 2016)

Glucólisis. Entre las enzimas de esta vía en el camarón, se ha caracterizado la hexocinasa (HK), que cataliza la primera reacción transfiriendo un grupo fosfato del ATP a la glucosa, usando Mg^{2+} como cofactor para formar G6P y ADP. La HK del camarón, es inducida por hipoxia en branquias y músculo luego de 1 h de exposición (Soñanez-Organis *et al.* 2011). Recientemente, se identificó una segunda isoenzima (HK2), cuya tendencia indica que también es inducida por hipoxia en hepatopáncreas luego de 6 h de exposición (Flores-Sauceda, 2022). Estos estudios indican que ambas isoformas son reguladas en hipoxia, ya que, durante el estrés, aumenta su expresión casi de forma inmediata y luego, en tiempos más prolongados, disminuye o reestablece a los niveles de normoxia. Este patrón en la expresión ocurre de forma similar durante la reoxigenación en hepatopáncreas, branquias y músculo, siendo esta inducción mediada por HIF-1 (Soñanez-Organis *et al.* 2011; Flores-Sauceda 2022).

Las enzimas fosfofructocinasa (PFK), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y

piruvato cinasa (PK) también se identificaron en el camarón blanco. PFK aumenta su expresión en hepatopáncreas bajo condiciones de hipoxia por tiempos cortos (3 h) manteniéndose así por tiempos más prolongados (48 h). Aparentemente HIF-1 está involucrado en la regulación de la expresión de PFK, por lo que ésta enzima podría ser un punto clave para acelerar la glucólisis para producir ATP anaeróbicamente, siendo primordial para sensar el nivel de energía en los camarones (Cota-Ruiz *et al.*, 2015, 2016).

GAPDH es más abundante en branquias que en hepatopáncreas y su expresión aumenta a las 3 y 24 h de hipoxia y reoxigenación siendo regulada por HIF-1 (Camacho-Jiménez *et al.*, 2019, 2018). Así mismo, se ha identificado que PK1 es más abundante en musculo que en hepatopáncreas y que su expresión es inducida en el primero pero inhibida en segundo luego de 12 h de exposición a hipoxia (Cruz-Moreno y Yepiz-Plascencia, datos no publicados). HIF-1 regula a PK1 contribuyendo a la patogénesis del virus de la mancha blanca (WSSV) a través de la inducción del efecto Warburg, necesario para la replicación viral (Godoy-Lugo *et al.*, 2019).

Gluconeogénesis. Las enzimas gluconeogénicas piruvato carboxilasa (PC), fosfoenol piruvato carboxicinas (PEPCK) y fructosa 1,6-bifosfatasa (FBP) también se han caracterizado en el camarón blanco. Aunque en mamíferos se ha demostrado que PC es regulada transcripcionalmente por HIF-1 en hipoxia, aun no existe evidencia de la participación de este factor de transcripción en la expresión de PC en el camarón, aunque si se sugiere, debido a que ésta es inducida por hipoxia a corto plazo (Granillo-Luna *et al.*, 2022). Las dos isoformas de PEPCK conocidas en el camarón se inducen en hepatopáncreas (Reyes-Ramos *et al.*, 2018), al igual que FBP en el mismo tejido pero no de forma inmediata (48 h), y dicha inducción es inhibida cuando HIF-1 es silenciado (Cota-Ruiz *et al.*, 2015, 2016). Esto sugiere una movilización de los carbohidratos desde el hepatopáncreas hacia otros tejidos a través de la hemolinfa, ya que coincide con el aumento de glucosa por efecto de la deficiencia de oxígeno en plasma (Soñanez-Organis *et al.*, 2009).

La información hasta ahora generada confirma que el camarón blanco, al igual que otros crustáceos, utiliza diferentes rutas metabólicas en respuesta a diferentes condiciones estresantes relacionadas con el nivel de oxigenación. Dichas respuestas podrían ser moduladas mediante la expresión tejido-específica de las enzimas involucradas, y en donde HIF-1 es un regulador transcripcional (**Fig. 1**). Lo anterior para satisfacer la demanda energética necesaria durante su adaptación; sin embargo, se desconoce el panorama detallado de las diversas vías metabólicas para lograrlo.

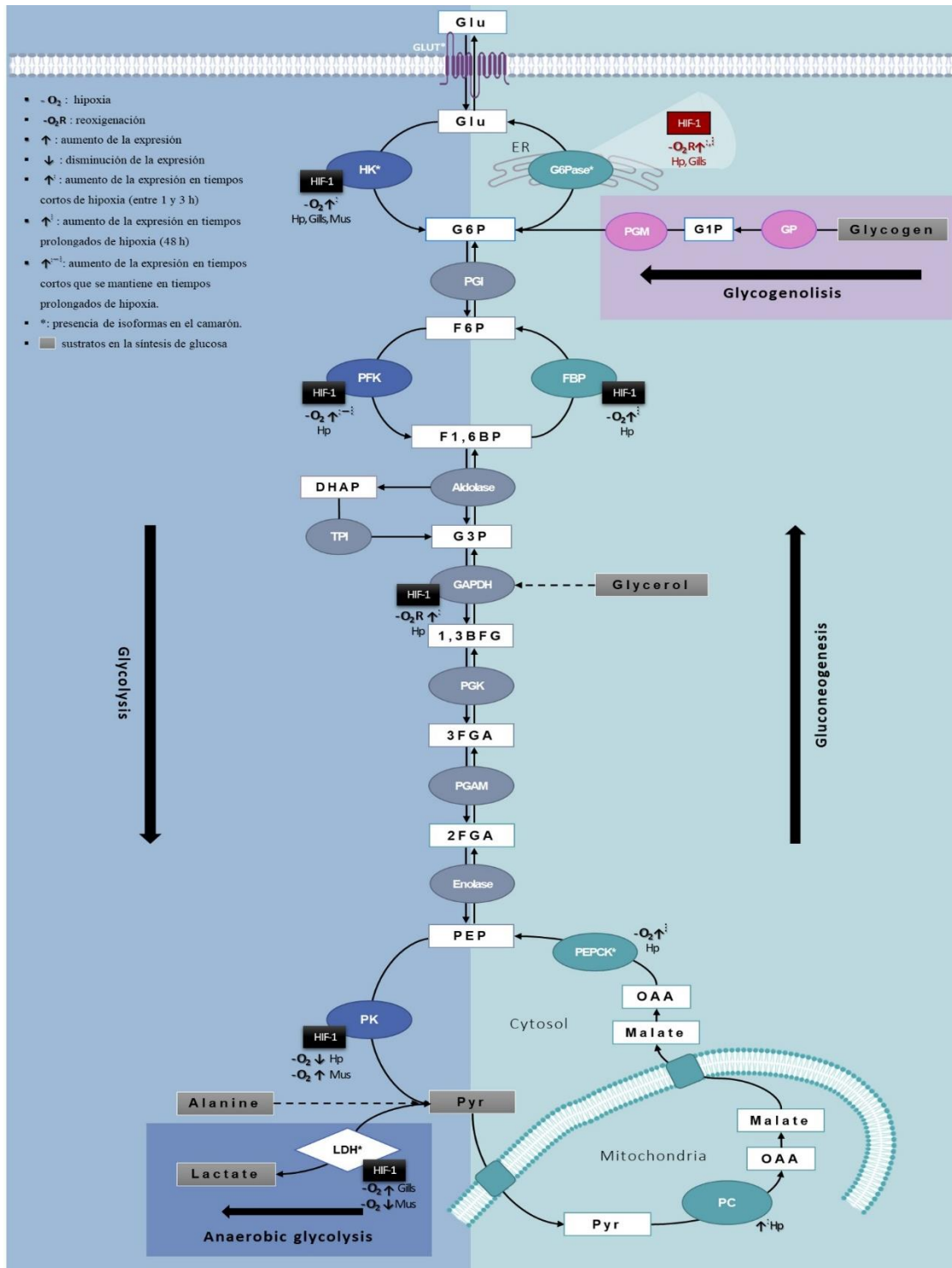


Figura 1. Diagrama general de las respuestas condición-tejido-tiempo específicas de las enzimas de la glucólisis, glucólisis anaerobia, gluconeogénesis y glucogenólisis en el camarón. Glucólisis: HK: Hexoquinasa; PGI: Fosfoglucosa isomerasa; FPF: fosfofructoquinasa; Aldolasa; TPI: triosa fosfato isomerasa; GAPDH: Glicerinaldehído 3 fosfato deshidrogenasa; PGK: fosfoglicerato quinasa; PGAM: fosfoglicerato mutasa; PK: Piruvato quinasa; LDH: lactato deshidrogenasa; Gluconeogenesis: PC: Piruvato carboxilasa; PEPCK: Fosfoenol piruvato carboxiquinasa; FBP: Fructosa 1,6-bisfosfatasa; G6Pase: Glucosa 6-fosfatasa. Glucogenólisis: GP: glucógeno fosforilasa; PGM: Fosfoglucomutasa. HIF-1: factor de transcripción inducible por hipoxia.

1.2.5. Glucosa 6 fosfatasa

La glucosa 6 fosfatasa (G6Pasa, EC: 3.1.3.9), también conocida como G6PC es una enzima que juega un papel crítico en la homeostasis de la glucosa en los organismos, participando en las vías de gluconeogénesis y glucogenólisis. Esta enzima remueve el fosfato de la glucosa 6-fosfato (G6P) para producir glucosa, que es liberada al torrente sanguíneo (van Schaftingen y Gerin, 2002). Durante la gluconeogénesis la G6P no puede convertirse en glucosa por reacción reversible de la hexoquinasa debido a que la energía libre de Gibbs sería muy positiva. En su lugar, la G6Pasa lleva a cabo esta reacción de hidrólisis (**Fig. 2**).

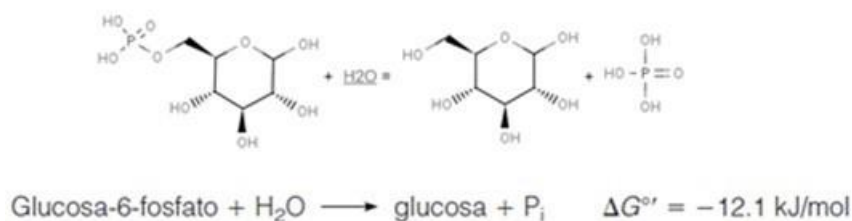


Figura 2. Reacción enzimática de la glucosa 6-fosfatasa

Un estudio realizado con una G6Pasa marcada de un adenovirus recombinante mostró que los aminoácidos Lys⁷⁶, Arg⁸³, His¹¹⁹, e His¹⁷⁶ forman parte del sitio activo, ya que mutaciones en cualquiera de estos residuos inactivan a la enzima. Además identificaron a His¹⁷⁶ como el aminoácido que actúa como nucleófilo uniéndose covalentemente al grupo fosfato de la G6P formando un intermediario fosfohistidina-enzima durante la catálisis y a His¹¹⁹ como donador de un protón necesario para la liberación de la glucosa (**Fig. 3**) (Ghosh *et al.*, 2002).

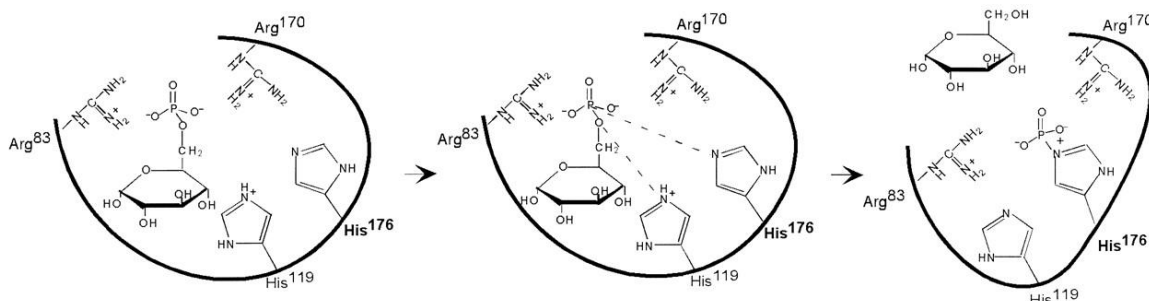


Figura 3. Mecanismo propuesto de reacción de la G6Pasa (Ghosh *et al.*, 2002).

En vertebrados el ayuno o inanición prolongada conduce a la activación crónica de la gluconeogénesis y requiere una mayor expresión de los genes de dichas enzimas. Este proceso normalmente se logra mediante la regulación de la expresión génica a nivel de la transcripción (Oh *et al.*, 2013). La G6Pasa se activa ante niveles bajos de glucosa en la sangre o cuando existe una demanda energética mayor, principalmente durante periodos de inanición o exposición a factores estresantes, de ahí la importancia de dilucidar su rol en condiciones específicas y su contribución para mantener estables los procesos celulares (Hah *et al.*, 2002). La G6Pasa es más abundante en el hígado, pero también se expresa en riñón y en menor medida en el intestino de mamíferos, asimismo, se han encontrado isoformas con expresión en otros tejidos entre los que se destaca el músculo y el cerebro.

Específicamente, se ha determinado que la G6Pasa está asociada a la membrana del retículo endoplásmico y realiza su función en el lumen mediante un complejo enzimático compuesto por una unidad catalítica, un transportador de G6P, un transportador de glucosa y un transportador de Pi. El modelo de hidrólisis de G6P hasta ahora aceptado, propone que diferentes transportadores importan el sustrato de la enzima al lumen donde se lleva a cabo la catálisis, y posteriormente exportan los productos (glucosa y fosfato inorgánico) al citoplasma (Hutton y O'Brien, 2009). El transporte de la glucosa en el retículo endoplásmico podría estar facilitado por los transportadores de glucosa transmembranales durante su procesamiento (Marcolongo *et al.*, 2013). También se ha propuesto que el transporte de la G6P a través del retículo endoplásmico, ocurre por medio de una translocasa (G6P translocasa) (Arion *et al.*, 1980). Alteraciones en esta proteína están asociadas a la aparición de la enfermedad del almacenamiento de glucógeno tipo 1b (Soty *et al.*, 2012), aunque aún no está completamente definido el mecanismo.

Los genes de las G6Pasas en vertebrados tienen entre 5 y 6 exones con tamaños aproximados desde

800 a 6000 pares de bases y están, en su mayoría, localizados en el genoma en 17q21 (Wang *et al.*, 2015). Las secuencias de aminoácidos de las G6Pasas de mamíferos tienen un tamaño en promedio de 357 aminoácidos (aproximadamente 40 kDa), con motivos conservados entre la familia de las fosfatasas donde los aminoácidos que intervienen en su actividad catalítica son completamente conservados. La unidad catalítica G6Pasa está anclada a la membrana del retículo endoplásmico por 9 hélices transmembranales con su extremo amino orientado hacia el lumen y el extremo carboxilo hacia el citoplasma (Ghosh *et al.*, 2002), mientras que la proteína transmembranal encargada del transporte de G6P, una translocasa del retículo endoplásmico, está orientada con sus dos segmentos terminales hacia el citoplasma (Soty *et al.*, 2012).

1.2.6. Isoformas de G6Pasa

Hasta el momento, se han identificado tres genes diferentes que codifican tres isoformas de G6Pasa (I, II y III). Los genes, denominados *g6pc*, *g6pc2* y *g6pc3*, pueden haberse originado durante la evolución de los vertebrados, por dos rondas de duplicación del genoma (Wang *et al.*, 2015) y se han estudiado principalmente en mamíferos con más énfasis en los humanos debido a su participación en diferentes patologías como la enfermedad por almacenamiento de glucógeno, hiperlipidemia, hiperuricemia y acidemia láctica, entre otras (Marcolongo *et al.*, 2013). Aunque la homología entre las secuencias de genes y proteínas es baja (35 a 40,7 kDa), las tres isoformas tienen altamente conservado el motivo fosfatidato fosfatasa 2 (PAP2), y una topología similar que es transmembrananal en el RE, características comunes en estas proteínas. Las tres enzimas difieren en sus patrones de expresión y propiedades cinéticas, cada una de las cuales se expresa en diferentes tejidos. La G6Pasa I se expresa mayormente en tejidos gluconeogénicos como el hígado y los riñones y, en menor medida, en el intestino, la G6Pasa II predomina en los islotes pancreáticos y es posible que se exprese en un subconjunto de células α , y la G6Pasa III es ubicua en músculo, riñón y cerebro (Marcolongo *et al.*, 2013).

En mamíferos, la isoforma I se caracteriza por hidrolizar preferentemente glucosa-6-fosfato (G6P), la isoforma II funciona principalmente como un componente del sensor de glucosa en células β , y su sobreproducción en líneas celulares por transfección ha mostrado poco o ningún efecto sobre la

hidrólisis de G6P, mientras que la isoforma III, además de la hidrólisis de G6P, se encarga preferentemente de hidrolizar otros sustratos como p-nitrofenil fosfato (pNPP) y 2-desoxi-glucosa-6-fosfato (Guionie *et al.*, 2003; Hutton y O'Brien, 2009; Wang *et al.*, 2015).

A pesar de que existe un amplio estudio sobre las isoformas de la G6Pasa en vertebrados superiores, la información en vertebrados inferiores es menos extensa, pero se ha podido identificar más de una isoforma con diferentes patrones de expresión y regulación específica en algunas especies. Por ejemplo, en un pez carnívoro (*Scophthalmus maximus*) el silenciamiento con RNAi del factor de transcripción de la gluconeogénesis FoxO1 inhibe la expresión de la G6Pasa I. Sin embargo, la G6Pasa II se induce, indicando una correlación negativa con este factor de transcripción (Pan *et al.*, 2019). En una línea de trucha arcoíris con bajo contenido de grasa muscular se demostró la inducción de G6Pasa I y II por efecto de la administración de insulina. Sin embargo, en otra línea con alto contenido de grasa muscular disminuyó la expresión de la isoforma I, mientras que la isoforma II permaneció abundante y sin cambios, lo que indica el importante papel de la G6Pasa II en la síntesis de glucosa en estos organismos (Jin *et al.*, 2014b). Por otro lado, la administración de glucosa desencadena la inducción de las dos isoformas de G6Pasa durante las primeras horas del desafío, y disminuye después de 8 horas, lo que indica que la glucosa, en primera instancia, no ejerce un efecto inhibitorio de la gluconeogénesis como en mamíferos en las primeras horas (Jin *et al.*, 2014a).

En invertebrados la información es todavía más escasa, pero se ha podido detectar actividad de G6Pasa en tejidos musculares de anélidos, moluscos, crustáceos, insectos, entre otros, demostrando inequívocamente que la actividad de esta enzima está presente en una amplia variedad de músculos en todo el reino animal (Surholt y Newsholme, 1981). Además, se sabe que la G6Pasa identificada en el anfioxo *Branchistoma japonicum*, un cefalocordado considerado el arquetipo de los vertebrados (ocupando una posición nodal de invertebrados a vertebrados), parece ser más cercana a la G6PC3 de vertebrados de acuerdo a análisis filogenéticos, por lo que se propuso que es clave para la homeostasis de la glucosa en anfibios (Wang *et al.*, 2015). Estos estudios demuestran, a pesar de las diferencias taxonómicas, la presencia y conservación de la G6Pasa, sugiriendo, la existencia de isoenzimas que participan en su metabolismo como sucede en vertebrados. Más de una isoforma de la G6Pasa activa en un mismo organismo, codificada por genes diferentes, permite inferir que, aunque lleven a cabo la misma actividad catalítica, su regulación y utilidad para las células podría variar, confiriendo al organismo una zona más amplia de adaptación frente a diversas

condiciones que se estén experimentando.

Al inicio de este trabajo de investigación no existían publicaciones sobre el análisis específico de genes que codifican para esta enzima o sus isoformas en crustáceos, incluyendo al camarón blanco *L. vannamei*. No obstante, existían datos preliminares obtenidos experimentalmente en el Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C (datos no publicados), que junto al estudio del transcriptoma del camarón (Ghaffari *et al.*, 2014) indicaban la presencia de una secuencia codificante de la G6Pasa. Esta información permitió el planteamiento de preguntas dirigidas a encontrar y analizar los componentes del gen y mRNA de esta enzima en camarón, así como entender el papel que desempeña en el metabolismo de la glucosa y su regulación frente a condiciones de estrés típicas. Además, se sugirió la presencia de isoformas ya que las diferencias entre éstas, así como su distribución tisular y patrones de expresión, son características importantes para lograr una mayor comprensión de su implicación fisiológica en los organismos.

1.3. Hipótesis

En el genoma de camarón existe al menos un gen para la glucosa-6-fosfatasa que se expresa de manera tejido específica en normoxia, hipoxia y reoxigenación, y es regulado de forma diferencial por HIF-1 en *Litopenaeus vannamei*.

1.4. Objetivo General

Caracterizar los genes de la glucosa-6-fosfatasa del camarón blanco y evaluar la respuesta a la hipoxia y reoxigenación sobre su expresión, mediada por HIF-1.

1.5. Objetivos Específicos

1. Analizar la estructura de los genes de la G6Pasa en camarón
2. Evaluar el efecto de la hipoxia y reoxigenación sobre la expresión de la G6Pasa en diferentes tejidos
3. Investigar la regulación de la G6Pasa vía HIF-1 en respuesta a la hipoxia y reoxigenación

1.6. Sección Integradora

Los resultados de esta tesis permitieron la publicación de dos artículos los cuales se presentan a continuación. La primera publicación titulada *The gluconeogenic glucose-6-phosphatase gene is expressed during oxygen-limited conditions in the white shrimp Penaeus (Litopenaeus) vannamei: Molecular cloning, membrane protein modeling and transcript modulation in gills and hepatopancreas* se publicó en la revista Journal of Bioenergetics and Biomembranes el 27 de mayo de 2021. Este artículo describe la caracterización molecular de la G6Pasa (posteriormente nombrada como G6Pasa1) identificada en el camarón, siendo el primer reporte que estudia de manera específica dicha enzima en crustáceos.

En este trabajo se reportan las secuencias de nucleótidos del gen y el transcrito, así como la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida. Se describe a la G6Pasa del camarón, como una enzima con las características típicas de las de vertebrados demostrando, además, que su expresión es regulada en diferentes tiempos de hipoxia, con un patrón de expresión tejido-específico. Además, refuerza el importante papel que tienen las branquias y hepatopáncreas en la supervivencia de este organismo frente a los efectos del estrés por limitación de oxígeno, sugiriendo la síntesis de glucosa *de novo* no sólo por la vía gluconeogénica, sino también a través de la glucogenólisis, rutas metabólicas donde dicha enzima está involucrada.

El segundo artículo titulado *Shrimp Glucose-6-phosphatase 2 (G6Pase 2): A second isoform of G6Pase in the Pacific white shrimp and regulation of G6Pase 1 and 2 isoforms via HIF-1 during hypoxia and reoxygenation* ha sido sometido para su publicación a la revista Journal of

Bioenergetics and Biomembranes, enviado el 7 de noviembre de 2022, cuyo estatus actual es: en revisión.

En este artículo se reporta la segunda isoforma identificada en el camarón, la cual se nombró como G6Pasa2. La secuencia del transcrito es obtenida experimentalmente y publicada junto a su caracterización molecular por métodos bioinformáticos, haciendo especial énfasis en la comparación entre ambas isoformas en el camarón hasta ahora identificadas. La G6Pasa1 y G6Pasa2 de este crustáceo tienen un tamaño y estructura similar, pero solo comparten alrededor del 35% de identidad entre las secuencias de aminoácidos, difiriendo principalmente en el número de hélices transmembranales y la orientación de los extremos N y C terminales de la proteína obtenidos en la predicción topológica. Mientras que la secuencia del gen de la isoforma 1 fue exitosamente descrita en el artículo mencionada arriba, el gen de la isoforma 2 no pudo obtenerse experimentalmente debido a su complejidad estructural, lo que podría indicar, aunado a lo anterior, diferencias en su regulación.

En este estudio se reporta la actividad enzimática de la G6Pasa en hepatopáncreas branquias y músculo de camarones en normoxia, mostrando que existe síntesis de glucosa *de novo* en buenas condiciones de crecimiento del camarón. También se demuestra que el factor de transcripción HIF-1 regula ambas isoformas, siendo la G6Pasa1 inhibida a las 3 y 48 h de hipoxia en hepatopáncreas, e inducida a las 3 h en branquias, pero estimulada en reoxigenación en tiempos cortos de exposición, mientras que la G6Pasa2 aumenta su expresión en reoxigenación a las 3 y 48 horas, siendo todos estos cambios modulados por HIF-1, respuestas que pudieron analizarse gracias al silenciamiento por RNAi de este factor de transcripción.

Las dos publicaciones descritas aquí, además de cumplir los objetivos planteados en esta tesis, muestran que las isoformas de la G6Pasa encontradas en el camarón blanco, participan en la respuesta a estrés por diferentes condiciones de oxigenación. Además, se expone el patrón complejo de regulación tejido-específica de la expresión de las G6Pasas, exponiendo a HIF-1 como un regulador de esta respuesta. Combinados estos resultados, revelan respuestas bioquímicas, moleculares y fisiológicas que contribuyen a la capacidad adaptativa del camarón a sobrevivir a diversos estresores.

**2. THE GLUCONEOGENIC GLUCOSE-6-PHOSPHATASE GENE IS EXPRESSED
DURING OXYGEN-LIMITED CONDITIONS IN THE WHITE SHRIMP *Penaeus*
(*Litopenaeus*) *vannamei*: MOLECULAR CLONING, MEMBRANE PROTEIN
MODELING AND TRANSCRIPT MODULATION IN GILLS AND
HEPATOPANCREAS**

Laura E. Hernández-Aguirre, Keni Cota-Ruiz, Alma B. Peregrino-Uriarte, Silvia
Gómez-Jiménez, Gloria Yepiz-Plascencia

Publicado el 27 de mayo de 2021

Journal of Bioenergetics and Biomembranes 53, 449 – 461

DOI: 10.1007/s10863-021-09903-6



The gluconeogenic glucose-6-phosphatase gene is expressed during oxygen-limited conditions in the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: Molecular cloning, membrane protein modeling and transcript modulation in gills and hepatopancreas

Laura E. Hernández-Aguirre¹ · Keni Cota-Ruiz² · Alma B. Peregrino-Uriarte¹ · Silvia Gómez-Jiménez¹ · Gloria Yepiz-Plascencia¹

Received: 16 November 2020 / Accepted: 14 May 2021 / Published online: 27 May 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

Abstract

The white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* is the most economically important crustacean species cultivated in the Western Hemisphere. This crustacean shifts its metabolism to survive under extreme environmental conditions such as hypoxia, although for a limited time. Glucose-6-phosphatase (G6Pase) is a key enzyme contributing to maintain blood glucose homeostasis through gluconeogenesis and glycogenolysis. To our knowledge, there are no current detailed studies about cDNA or gene sequences of G6Pase from any crustacean reported. Herein we report the shrimp *P. (L.) vannamei* cDNA and gene sequences. The gene contains seven exons interrupted by six introns. The deduced amino acid sequence has 35% identity to other homolog proteins, with the catalytic amino acids conserved and phylogenetically close to the corresponding invertebrate homologs. Protein molecular modeling predicted eight transmembrane helices with the catalytic site oriented towards the lumen of the endoplasmic reticulum. G6Pase expression under normoxic conditions was evaluated in hepatopancreas, gills, and muscle and the highest transcript abundance was detected in hepatopancreas. In response to different times of hypoxia, G6Pase mRNA expression did not change in hepatopancreas and became undetectable in muscle; however, in gills, its expression increased after 3 h and 24 h of oxygen limitation, indicating its essential role to maintain glycemic control in these conditions.

Keywords G6Pase · Gluconeogenesis · Glycogenolysis · Hepatopancreas · Gills · Dissolved oxygen

Introduction

Glucose-6-phosphatase (G6Pase) (EC 3.1.3.9) is a gluconeogenic and glycogenolytic enzyme that removes phosphate from glucose-6-phosphate (G6P) to release glucose into the bloodstream in the final step of each pathway (van Schaftingen and Gerin 2002). G6Pase is found mainly in liver and kidney of vertebrates and plays the important

role of providing glucose during starvation. Unlike most phosphatases acting on water-soluble compounds, it is a membrane-bound enzyme associated with the endoplasmic reticulum. In 1975, W. Arion and co-workers proposed a model for the G6Pase as an unspecific phosphatase with its catalytic site oriented towards the lumen of the endoplasmic reticulum (ER) (Arion et al. 1975), and that the substrate was provided by a translocase specific for G6P, thereby accounting for the specificity of the phosphatase for G6P in intact microsomes. Distinct transporters would allow inorganic phosphate and glucose to leave the vesicles. At variance with this substrate-transport model, other models propose that conformational changes play an important role in the properties of G6Pase. The last 10 years have witnessed important progress in the knowledge of the glucose-6-phosphate hydrolysis system. The genes encoding G6Pase and the glucose-6-phosphate translocase have been cloned

✉ Gloria Yepiz-Plascencia
gyepiz@ciad.mx

¹ Biología de Organismos Acuáticos, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas, No. 46, Colonia La Victoria, Sonora 83304 Hermosillo, Mexico

² DOE-Plant Research Laboratory, Michigan State University, East Lansing, MI 48824, USA

and shown to be mutated in glycogen storage disease type Ia and type Ib, respectively. A gene encoding a G6Pase-related protein is specifically expressed in pancreatic islets. Specific potent inhibitors of G6Pase and of the glucose-6-phosphate translocase have been synthesized or isolated from microorganisms. This information as well as other findings support the model initially proposed by Arion. Much progress has also been made about the regulation of the expression of G6Pase by insulin, glucocorticoids, cAMP and glucose (van Schaftingen and Gerin 2002).

G6Pase is necessary to maintain glucose homeostasis and regulates G6P reserves in response to low blood glucose levels or during high energy demands in mammals (Trandaburu 1977; Surholt and Newsholme 1981; Hah et al. 2002; Varga et al. 2019). There is limited information about G6Pase in invertebrates. In the crab *Carcinus maenas*, the G6Pase enzyme from the digestive gland (hepatopancreas) has high metabolic plasticity and low specificity and plays an important role in systemic glucose homeostasis (Loret and Devos 1992). Changes in G6Pase have been reported in invertebrates. For example, G6Pase activity increased during fasting in hepatopancreas in the crab *Menippe mercenaria*, without changes in muscle (Scholnick et al. 2006). In contrast, G6Pase decreased in hepatopancreas of WSSV infected shrimp *Penaeus monodon* (Mathew et al. 2007), while in the chordate amphioxus *Branchiostoma japonicum*, its expression and activity increased in the digestive diverticulum during fasting (Wang et al. 2015); thus, it is important to understand the specific regulation and G6Pase contribution to maintain cellular processes (Hah et al. 2002).

As mentioned before, the integral membrane G6Pase activity is in the lumen of the ER formed by a complex of the catalytic subunit and a transporter of G6P, producing glucose and inorganic phosphate (Pi) (Marcolongo et al. 2013). Most G6Pases genes have five or six exons with sizes from 800 to 6,000 bp; in humans, the genes are located at 17q21 in the genome (Wang et al. 2015). There are three isoforms of G6Pase in vertebrates and they share structural features, but generally differ in organ expression in specific conditions (Marcolongo et al. 2013).

Low dissolved oxygen (DO) or hypoxia is one of the most essential variables that affect aquatic environments. The DO at which the animals begin to suffer hypoxia varies between species, but generally, adverse effects such as reduced feeding and growth rate, decrease culture yield, and mass mortality of crustaceans may appear when the DO concentration falls below 2 mg/L (Diaz 2001; Wu 2002); however, most organisms have biochemical and physiological mechanisms to respond to oxygen limitations for survival.

The shrimp *P. (L.) vannamei* is one of the most important crustacean species for global aquaculture, generating high economic resources for shrimp farming countries (Bostock et al. 2010). This shrimp species is an oxyconformer organism

that can adjust its metabolism depending on the oxygen available to survive (Wannamaker and Rice 2000) and can withstand DO concentrations as low as 0.2 mg/L for a short time (Pérez-Rostro et al. 2004).

Several studies have reported that shrimp exposure to hypoxia changes the expression of genes encoding enzymes of glycolysis and the Krebs cycle pathways (Ulaje et al. 2019). In addition, the activity of enzymes of anaerobic metabolism is increased as a strategy to maintain the energy balance to survive hypoxic stress (Soñanez-Organis et al. 2010, 2011; Cota-Ruiz et al. 2015; Camacho-Jiménez et al. 2018). Furthermore, higher expression of the genes for the gluconeogenic enzymes fructose-1,6-bisphosphatase (FBP), (Cota-Ruiz et al. 2015, 2016) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) (Reyes-Ramos et al. 2018) occurs in hepatopancreas in response to prolonged periods of hypoxia in an organ-specific manner. This is an indication that the gluconeogenic pathway is stimulated. Likewise, the consumption of glycogen reserves in crustaceans due to hypoxia, and its subsequent restoration in post-hypoxic recovery through the recycling of lactate generated in anaerobic metabolism, indicates that these animals are capable of performing both, synthesis and catabolism of glycogen (Ellington 1983; Hervant et al. 1999). However, the metabolic adaptation mechanisms have just started to be unraveled.

Current knowledge about the expression and regulation of G6Pase gene in invertebrates is minimal and, to our knowledge, there are no profound studies about G6Pases genes sequences in crustaceans. In this work, we report the gene structure, coding sequence (CDS), phylogenetic analysis, topology prediction and gene expression in three organs under normoxic conditions and during different periods of hypoxia in hepatopancreas and gills of G6Pase from the white shrimp *P. (L.) vannamei* to contribute to the knowledge of crustacean shrimp energy metabolism and their responses to hypoxia.

Materials and methods

G6Pase cDNA sequence

Total RNA was extracted from gills of healthy juvenile shrimp using TRI® (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, USA) according to the manufacturer instructions and to remove genomic DNA (gDNA) traces, it was treated with DNase I (Roche, Mannheim, Germany). RNA integrity was confirmed by 1% gel agarose. The first-strand cDNA synthesis from RNA was done using the QuantiTect Reverse transcription system (Qiagen, Hilden, Germany). For this, 1000 ng of total RNA were reverse transcribed with RT Primer Mix. Specific primers (Table 1) were designed for our study for the G6Pase sequence from the partially

Table 1 Specific primers used

Primers	Sequence (5'3')
qG6PF1	GCTGCAAGGGGCATTACTAC
qG6PR1	GCGATGACCCCCATAATACA
qG6PF2	GAAACTAGACCACTTCTGCGT
qG6PR2	TCCAAGCGAAATGCCCAACA
G6PF2	ATGGCAGAGCCTGATCTTCA
G6PR2	ACACATGGTCAAAAGAAAGTGC
L8F2	TAGGCAATGTCATCCCCATT
L8R2	TCCTGAAGGGAGCTTTACACG

annotated *P. (L.) vannamei* genome (Zhang et al. 2019) and transcriptomic data (Ghaffari et al. 2014) using Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>) and Oligo Calc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>).

The complete coding sequence (CDS) was obtained by PCR using the G6PF2/G6PR2 primers. For a 20 µL reaction, the mix contained 10 µL Hot Start Taq 2× Master Mix (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA), 500 nM of Fw and Rv primers, 6 µL milliQ water, and 2 µL of cDNA (equivalent to 50 ng of total RNA) and was amplified under the following conditions: 94 °C for 3 min, followed by 94 °C for 30 s, 55 °C for 1 min and 68 °C for 1 min and 40 s per cycle for 42 cycles and finally, 72 °C for 10 min in a PTC 200 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, California, USA). Both strands of the PCR products were sequenced in the Laboratory of Genomic Analysis and Technology Core of the University of Arizona (Tucson, Arizona, USA) by the dideoxy chain-termination method. cDNA sequence and deduced protein were compared to nucleotide and protein GenBank databases using the BLAST algorithm (Altschul et al. 1990) at the National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD. CDS analyses were done using ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>), Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) and ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) bioinformatics tools.

G6Pase gene cloning and structure

Genomic DNA was isolated from the muscle of a healthy juvenile shrimp using proteinase K digestion, phenol–chloroform extraction, and ethanol precipitation (Bradfield and Wyatt 1983). The complete *G6Pase* gene sequence was obtained by overlapping two PCR fragments, the 5' fragment using G6PF2/qG6PR1 primers and the 3' fragment with qG6PF1/G6PR2 primers (Table 1). The reaction was done using 12.5 µL of Hot Start Taq 2× Master Mix, 500 nM of each Fw and Rv primer, 25 ng of gDNA, and 9.5 µL of milliQ water to a final volume of 25 µL under the following conditions: a first denaturing step of 75 °C for 15 min

and 94 °C for 3 min, followed by 94 °C for 30 s, 59 °C for 1 min and 68 °C for 2 min per cycle for 36 cycles and finally, 72 °C for 10 min in a PTC-200 Thermal Cycler. PCR products were cloned in the pGEM-T Easy Vector System I (Promega, Madison, WI, USA) and used to transform TOP10 *Escherichia coli* competent cells. Recombinant plasmids were sequenced thoroughly in both DNA strands. The exon–intron identification was done with Spling (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/splign/splign.cgi>) and SnapGene (GSL Biotech).

Structural and phylogenetic analysis of protein sequence

Molecular weight and isoelectric point were calculated with ExPASy (https://web.expasy.org/compute_pi/). Search for domains and conserved motifs was done with Pfam 32.0 (<https://pfam.xfam.org/>). The topological model of the protein was predicted with the HMMTOP transmembrane topology prediction server (Tusnady and Simon 2001) and the representation in two dimensions was constructed with TMRPrest2D (Spyropoulos et al. 2004). The amino acid sequences alignment included 25 G6Pase amino acid sequences obtained from the NCBI database (Table 2) and was performed in CLUSTAL W (Larkin et al. 2007). The phylogenetic analyses were conducted using MEGA version X (Kumar et al. 2018) and the Maximum Likelihood method, based on the Le Gascuel model (Le and Gascuel 2008) with 1000 bootstrap replicates. All positions containing gaps and missing data were eliminated and the tree was rooted with two G6Pase halobacterial sequences from *Haloferax gibbonsii* and *Haloarcula hispanica*.

Hypoxia bioassay

Juvenile shrimp obtained from a local farm were acclimated in 100 L tanks connected to a closed circulation filtration system with seawater under normoxic conditions [5 mg DO/L], constant salinity and temperature (35 ppt and 28 °C, respectively), in the Laboratory of Marine Invertebrate Physiology. The shrimp were transported to the laboratory as postlarvae and maintained in quarantine for approximately two months until they reached the appropriate size. In this period, the animals were analyzed by molecular and microbiological tests (PCR and bacteriological count) to discard White Spot Syndrome Virus (WSSV), Taura Syndrome Virus (TSV), Infectious Hypodermal Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV), *Vibrio parahaemolyticus* and *Hepatobacter penaei* infected animals. Shrimp were fed with commercial feed equivalent to 3% of their dry weight in three portions per day with daily removal of residual food and feces and constant monitoring of temperature, salinity, ammonia, and dissolved

Table 2 G6Pase amino acid sequences used for phylogenetic analysis

Scientific name	Isoform	Gen Bank accession No
<i>Macrobrachium nipponense</i>	G6Pase*	ALK82315.1
<i>Varroa jacobsoni</i>	G6Pase 2	XP_022687819.1
<i>Centruroides sculpturatus</i>	G6Pase 2	XP_023224655.1
<i>Rhipicephalus microplus</i>	G6Pase*	AIW65716.1
<i>Tetranychus urticae</i>	G6Pase*	XP_015793132.1
<i>Rattus norvegicus</i>	G6Pase 1	NP_037230.2
<i>Danio rerio</i>	G6Pase*	NP_001157278.1
<i>Bos taurus</i>	G6Pase*	NP_001069592.1
<i>Astyanax mexicanus</i>	G6Pase*	XP_007234056.2
<i>Mus musculus</i>	G6Pase 1	NP_032087.2
<i>Mus musculus</i>	G6Pase 2	NP_067306.1
<i>Mus musculus</i>	G6Pase 3	NP_787949.2
<i>Cricetulus griseus</i>	G6Pase 2	RLQ65030.1
<i>Cricetulus griseus</i>	G6Pase 3	RLQ62406.1
<i>Homo sapiens</i>	G6Pase 1	NP_000142.2
<i>Homo sapiens</i>	G6Pase 2	Q9NQR9.1
<i>Homo sapiens</i>	G6Pase 3	Q9BUM1.2
<i>Globicephala melas</i>	G6Pase 2	XP_030705606.1
<i>Chanos chanos</i>	G6Pase 2	XP_030642465.1
<i>Cervus elaphus hippelaphus</i>	G6Pase 3	OWK14193.1
<i>Castor canadensis</i>	G6Pase 3	JAV36574.1
<i>Haloferax gibbonsii</i> ATCC 33,959	G6Pase*	ELZ83903.1
<i>Haloarcula hispanica</i> ATCC 33,960	G6Pase*	AEM55699.1
<i>Galendromus occidentalis</i>	G6Pase*	XP_003747144.1
<i>Penaeus (Litopenaeus) vannamei</i>	G6Pase	MW246958▲

*Not defined isoform

oxygen. Then, the shrimp (13.8 ± 1.4 g) were randomly distributed in 4 aquaria (11–12 shrimp/tank) and kept for three days in these tanks. Before the test, the shrimp were fed only once, and afterward, a total exchange of seawater was done in each aquarium. The molting stage of the shrimp was not identified but clearly recently molted specimens were discarded. The following treatments were performed: 0 h normoxia (control at the beginning of the test) [4.99 ± 0.16 mg DO/L, 28 ± 0.1 °C], 3 h hypoxia [1.5 ± 0.2 mg DO/L, 27.4 ± 0.2 °C], 24 h hypoxia [1.5 ± 0.2 mg DO/L, 27.2 ± 0.2 °C], and 48 h hypoxia [1.5 ± 0.3 mg DO/L, 27.1 ± 0.3 °C] in separate tanks. Normoxia was maintained by air bubbling with air diffuser stones, while hypoxia was produced by bubbling nitrogen decreasing the oxygen concentration progressively for 1 h. Dissolved oxygen and temperature were monitored every hour with a portable oximeter (model YSI proODO, Yellow Spring, OH, USA) and adjusted when necessary. Ammonia was monitored daily, and if necessary, water exchanges were done to keep levels below 3.0 mg/L. After time elapsed, 4–5 shrimp were sampled per treatment starting with the control group. The organs of each shrimp were dissected and placed in a cold microtube containing

10 volumes of TRI reagent (w/v), immediately frozen in a dry ice/96% ethanol mixture, and then stored at -80 °C until the analysis.

G6Pase mRNA quantification

G6Pase expression in normoxia was evaluated in hepatopancreas, gills, and muscle, while hepatopancreas and gills were used to analyze the effect of hypoxia by RT-qPCR (see below). Total RNA was isolated from 50 mg of each organ and treated with DNase I to remove gDNA remnants. The qG6PF2/qG6PR2 primers were used to amplify the G6Pase transcript to generate a 307 bp amplicon. One qPCR product per organ was sequenced in both directions to confirm the specificity of the quantification. The ribosomal protein L8 (GenBank accession no. DQ316258.1), that has been previously used as reference gene to normalize expression data for hypoxia studies in shrimp (Cota-Ruiz et al. 2015), was used with the primers L8F2/L8R2 previously designed in our laboratory to amplify a 166 bp fragment (Trasviña-Arenas et al. 2013) (Table 1). The G6Pase standard curve was performed using as a template a 765 bp purified PCR product previously obtained with the qG6PF2/G6PR2 primers with

1:10 serial dilutions (from 8×10^{-5} to 8×10^{-9} ng/ μ L) while the L8 standard curve was performed with serial dilutions 1:5 (from 25 to 4×10^{-2} ng/ μ L derived from total RNA) of gills cDNA to calculate amplification efficiency. As mentioned before, a 307 bp fragment was used to quantitate expression for G6Pase and a 166 bp fragment for ribosomal protein L8. cDNAs were synthesized for each organ using 500–750 ng of total RNA as a template with the QuantiTect Reverse Transcription Kit. Four technical replicates (two cDNA reactions for each RNA and two PCR reactions per cDNA) were analyzed in 4–5 shrimp per treatment. Due to the low abundance of G6Pase mRNA in hepatopancreas in hypoxia, the expression experiments were done in two stages. For normoxia expression in hepatopancreas, gills and muscle, and hypoxia in gills in the first stage, each qPCR reaction included 3 μ L of 5 $\times$ HOT FIREPol[®] EvaGreen[®] (Solis BioDyne, Tartu, Estonia), 500 or 700 nM of each primer for G6Pase or L8, respectively, 1 μ L of cDNA (equivalent to 25 ng of total RNA) and nuclease-free water for a final volume of 15 μ L. For hypoxia expression in hepatopancreas in the second stage, each qPCR reaction included 7.5 μ L of 2 $\times$ Sso Advanced universal SYBR[®] Green supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 500 or 600 nM of each primer for G6Pase or L8, respectively, 2 μ L of cDNA (equivalent to 100 ng of total RNA) and nuclease-free water for a final volume of 15 μ L; a non-template control reaction was included in each run to check PCR contamination. The reactions were performed in a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System thermal cycler (Bio-Rad) with an initial cycle of 95 $^{\circ}$ C for 12 min, followed by 43 cycles of 95 $^{\circ}$ C for 15 s, 60.2 $^{\circ}$ C for 20 s and 72 $^{\circ}$ C for 20 s in the first stage, and the protocol for the second stage was an initial cycle of 94 $^{\circ}$ C for 3 min, followed by 45 cycles of 95 $^{\circ}$ C for 15 s, 60.2 $^{\circ}$ C for 35 s and 72 $^{\circ}$ C for 55 s. Finally, a melting curve analysis was done with a gradual increase of temperature (0.5 $^{\circ}$ C/3 s) from 65 $^{\circ}$ C to 95 $^{\circ}$ C to examine the presence of primers dimers or non-specific amplifications. The expression of G6Pase relative to L8 was calculated with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Schmittgen and Livak 2008).

Statistical analysis

Data are presented as means $\pm$ SD or medians and ranges as indicated. The distribution of data was tested with the Shapiro–Wilk normality test. Homogeneity of variance was verified with Levene or Brown–Forsythe test. Data of G6Pase mRNA expression in different shrimp organs in normoxia were analyzed using one-way ANOVA and differences between means were detected with Tukey test. Because data of hypoxia effect in G6Pase mRNA expression in hepatopancreas and gills fail in normality assumption, Kruskal Wallis and Dunn tests were performed to assess differences between medians. All the analyses were done

in the NCSS 2020 software (NCSS LLC, Kaysville, Utah, USA) with a significance level of $p < 0.05$. Graphics were made in GraphPad Prism version 9.

Results

G6Pase gene, CDS, and deduced protein

The gene and cDNA sequences of G6Pase obtained from the white shrimp were deposited in GenBank with the accession number MW246958 (Fig. 1). The gene nucleotide sequence we obtained is 99.07% identical to the genome sequence deposited in GenBank by Zhang et al. (2019), and 99.8% identical to the transcript included in the transcriptomic data of Ghaffari et al. (2014). The gene sequence starting from the initial codon for MET, ATG, is 2823 bp long. The genomic sequence was obtained with two overlapping fragments from genomic DNA. It comprises seven exons of 86, 165, 207, 131, 252, 119, and 117 bp each, interrupted by six introns with five split codons. All the introns contain the consensus 5'-GT-AG-3' splice junctions necessary for correct RNA splicing of most eukaryotic genes (Breathnach et al. 1978) and the number and size of exons and introns correspond with the ones reported in other species (Wang et al. 2015). The average base composition A/T and G/C of the exons are 56.43% and 43.57%, respectively, whereas for the introns are 73% and 27%, respectively. The CDS was initially identified from gills cDNA and is 1,077 bp long encoding 358 amino acids residues from the initial methionine (ATG) to the stop codon (TAA) at position 1075, resulting in calculated values for the isoelectric point and molecular weight of 9.25 and 40.74 kDa, respectively. The catalytic amino acids were identified by sequence alignments. Analysis with the Pfam 32.0 tool revealed that shrimp G6Pase has the PAP2-glucose-6-phosphatase domain characteristic of all G6Pase isoforms and no signal peptide presence was predicted with signalP, which is typical of known G6Pases.

Homology and phylogenetic analysis of P. (L.) vannamei G6Pase protein sequence

BLAST analysis of the deduced protein indicated an identity of 23.7 to 35.9% with the G6Pase sequences from the fruit fly (*Drosophila melanogaster*, GenBank accession no. NP_001097063), human (*Homo sapiens*, GenBank accession no. P35575), zebrafish (*Danio rerio*, GenBank accession no. NP_001157278.1) and eastern river shrimp (*Macrobrachium nipponense*, GenBank accession no. ALK82315.1). The highest homology of the white shrimp G6Pase was found with *M. nipponense* and *D. rerio* with the catalytic amino acids contained in highly conserved regions (Fig. 2). The phylogenetic analysis of 25 G6Pase

G6PF2	
<u>ATGCGCAGAGCGCTGATCTTCAATTCTTTAATACAACTGAAAGTTGGAACCTGCGGAGTGTAGAAGTCATTTCTGATTACAAAGATAA</u> gaagtttctctg	86 nt
M A E P D L Q F F N T T E S W N L R S V E V I S D L Q D K	29 aa
tttactttataaatgtccatgggtaagttttgtatattataggaaggattatttctctgttttaggataattactgtgatattataacagcacaatg	
catattaatagtcgtggaatgtttataggaactgaagtttttcagtagtaattgttagtagggagtaactaagagttatgcaagtttgattttccag	87 nt
CTTCAACCTTATGAATCATGGGTGGTGCAGCTCTCTGTATTAGGTGACAATAGAGAAGCCTTACCTTCTTCTTCCGATTTTGTCTGGACTGAAGAATG	187 nt
L Q P Y E S W V V H V S V L G D N R E A F T F F F P I F A G L K N	62 aa
AGTTAGGAGCTCGTGCATATGGGCTGCGATTCTGGTGAATGGTCAAACTTCTTTTGAAGTGT gaggacatttattctttttgtccataggtta	251 nt
E L G A R A [L W A A I L V E W S N L L L K W	84 aa
aataaatatagttgtataaaacattatggacaatgatttcaatgtttctatttaccctttgtttattatattgtatatataattttatatatatatt	
ttttctatcaccataggtatttcaagatattgtttatgtttgatagttggatagcagaatattgtgaagatattatctggcaatatcttatgcttgag	
acctattaggagaataatttgaagtttaccagggaccaagtaaaaaatatatatattgatattctttttataactatgatgaccattaatataaccgaaa	
agagtgaataatgcacagcatactgaactctccagGCGATTGAGAGGAGCGACCCCTATTGGTGGAGCGGAGAGACCTCTTTGTACAATGAGGAACCTAG	317 nt
qG6PF2 A F R G D *R* P Y W W T G E T S L Y N E E T R	106 aa
<u>ACCACTTCTGCGTCAGTTTCCAAACACCTGTGAATCAGGTCTGGCACGCTTCAGGCCACCTCATGATGAATGTAGCACTCTTTATGTTGCTGCAAGG</u>	417 nt
P L L R Q F P N T C E S G P G T P S G *H* L M M N V A L F Y V A A R	139 aa
qG6PF1	
<u>GCCATTACTACATTTTTCATTGGAATTCACCACTTTGAA</u> gaagtggaatttagagatacaataactgattcttttcaattttttctaaagttttaat	458 nt
G I T T T F F I W N S T T L K	153 aa
gatattttcttatcatgaactcattgtctgtaagataaaatagttttgcaataattttacattttattcttctatgaaaattttccagggttgattat	
tctcatcaggtaattgaatgaatttctgtactatttttcagTAAAGTTGAGAAGTGGTTCTTCTGCATTCTGATATATAGCCTCTATATTGCTGGAATG	517 nt
K V Q K W F L A F L I Y S L Y I C W N	172 aa
qG6PR1	
<u>CAATGGTATTCTACGTCTTTACATCCAAGCTCATTTTGTTCATCAGTGTATTATGGGGTCTATCGCAG</u> gtatgtattagaatgagaatgtatacga	589 nt
A M V F I S *R* L Y I Q A H F V *H* Q C I M G V I A	196 aa
aaaaggtattatataattgagttaaaaagcaaaaccagaggacataatctgttaatatatgtataaaagaatgtgcacttaatatgcatttgaatatt	
ttgtattatctcttacttttccatgctgaatgagcaatgtaatatgttgatgtgattgactatgttactttttgttttttggGCTTATTGTTGG	602 nt
G L F V G	201 aa
qG6PR2	
<u>GCATTTCGCTTGGAGCAGTAACGTTTACTGAAACTTACAAAGACCCCTTCAGTTGTCTATAGCAGTTTCTCATCTTGTCTTCTGTGATGACATACTAT</u>	702 nt
H F A W S] S K R L L K L T K T L S V V I A V F L I L S S V M T Y Y	234 aa
CTCTTACTCTCCCAAGGAATGAATCCTCTGTGGACAGTTTCTCTGGCTCTCAACATTGCATGAGACCAGAGTATGTCAAGGTTGACACACAGCCTTACT	802 nt
L L L S Q G M N P L W T V S L A L K H C M R P E Y V K V D T Q P Y	267 aa
ATTGATTATGAGATTCACTGGAGCTGCCCTTGCAATAG gttagtagttttgatgtctggcatgtatgtttattgggggagaggtagtgatattacac	841 nt
Y L I M R F T G A A L A L G	281 aa
agcattaaaagttgacatttggatttctgatttacttttgagaaggactgatagaatatattttttataagtaacaatgtgttttcttatttgccttaaa	
ggatgaagtaaaaaaaaaaaaaaatgtttacattaaagttgatatttcttccaatgttgcagGCTAGGCATTTCATCAGAACAGAGGAAGGCAGT	875 nt
L G I S S E Q R K A V	292 aa
G GGTTCAGTCCCGGATCAGTCGCATACATGTTGTCTGGGGGTCAAGGGAGGCATACTGATTGGGAGAAATGCTGCAATAATTGAGgttaattgatgaatg	960 nt
V Q S R I S R I H M L L G V K G G I L I G R M S A I I Q	320 aa
taattgtgaataaatattgtgtggaaggtatgttatgaatgacttcagaatatttgataggggttgacttatgcattttatgttatatatctctg	
agaattacatgattctaaagggaaatgcagcattatgataatcacttatatgacttttttttaagttatctattctcatgcatactctttttgacagtg	
tcgaattaacctttgttgatatttttgaataacattatttttttatttggatatatatatatccattttttaggttaagctttttataataaaa	
ttgtttgtaagacaaagttagaaacattgcagacttccgtgtttatagcttttttgaagatttttttaccagtatataaagttgaatttttaaaatcaga	
ttcccaaaaggtatatatgacaaacagtggtatttttatatcccaactgaaacatatatgtaagagtaactcatggtatcactactatttttcttccct	
tgacagGCAAGCTTCCGAAGGATGACATGATCGTGTCTGCTGTCATTGTGCCTTAACGTTGCGCTTGCCCTTGATCATCATATCTGTGTTGCCCTC	1054 nt
A S F P K D D M I V F L V L S F G L N V A L P L I I I S V L P	351 aa
G6PR2	
<u>ACTTTCTTTTGGACATGTGTAA</u>	1077 nt
H F L L T M C	358 aa

Fig. 1 Nucleotide and amino acid sequences of the *G6Pase* gene of shrimp. Only the coding sequence is numbered. Primer sequences are underlined, split codons are in bold and underlined, initial Met and

stop codons are in gray. The catalytic amino acids are between asterisk * and the PAP2-G6Pase domain is between brackets []. Exons are presented in capital letters and introns in lowercase letters

sequences (Table 2) clearly showed two well-differentiated clusters between vertebrates and invertebrates locating the white shrimp sequence in the latter, within the same clade with the shrimp *M. nipponense* (35.9% identity) from other arthropods (Fig. 3).

G6Pase topological model

The 2D hypothetical model predicts seven transmembrane helices in the white shrimp G6Pase (Fig. 4). According to the topological analysis, three loops (in 177–190, 237–268,

319–328 positions), the catalytic amino acids (RHRH), and the N-terminal are oriented towards the ER lumen, and three loops (in 146–159, 207–218, 285–300 positions) and the C-terminal towards the cytoplasm, thus the G6Pase characteristic orientation of the active site is conserved.

Differential organ-expression of G6Pase in normoxia and hypoxia

G6Pase expression in hepatopancreas, gills and muscle was evaluated by RT-qPCR in normoxia (Fig. 5). Expression of

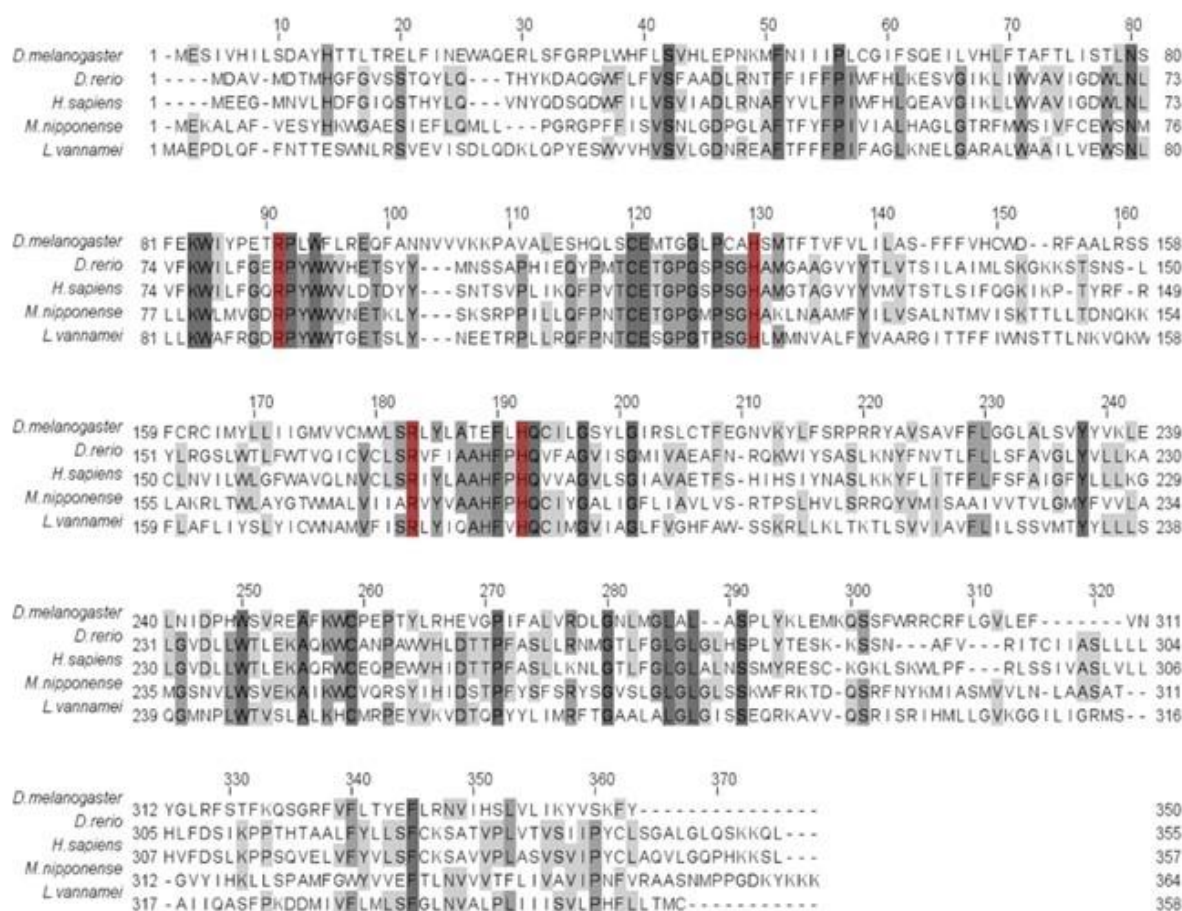


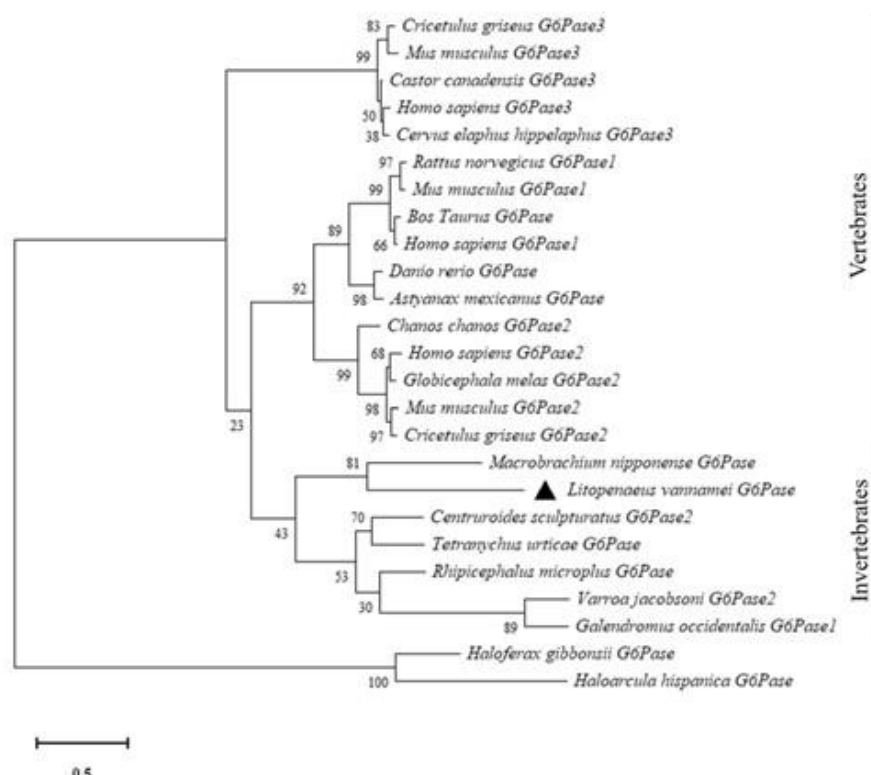
Fig. 2 Multiple alignment of the deduced amino acid sequences from *L. vannamei* G6Pase and selected species. The intensity of the gray color indicates higher conservation between sequences aligned, catalytic amino acids are highlighted in red

the shrimp G6Pase gene was detected in the three evaluated organs with the highest expression in hepatopancreas ($p < 0.05$), with 6.1 and 3.5-fold than in gills and muscle, respectively. Similar results were reported for the amphioxus *B. japonicum* that had a higher G6Pase expression in digestive diverticulum than in muscle and gills under developmental conditions (Wang et al. 2015). *B. japonicum* occupies a nodal evolutionary position from vertebrates and invertebrates. Likewise, G6Pase activity was 20 times higher in hepatopancreas than in claw muscle under feeding conditions in the stone crab *M. mercenaria* (Scholnick et al. 2006).

The effect of hypoxia on G6Pase relative gene expression was evaluated in hepatopancreas and gills by RT-qPCR (Fig. 6) and initially also evaluated in muscle, but expression in hypoxic conditions was undetectable. The PCR of amplification efficiencies and correlation coefficient in real

time were 91.1%, 0.99 and 90.5%, 0.99 for G6Pase and L8, respectively. No significant differences were detected within the treatments in hepatopancreas due to the high variability among the shrimp, although the means for the hypoxia groups are lower by approximately 0.5-fold compared to the normoxia control. In gills, there was a significant increase ($p < 0.05$) of 11.3 and 5.2-fold at 3 h and 24 h respectively compared to normoxia and no significant changes were detected at 48 h, but with a tendency to increase (2.1-fold) with respect to normoxia. The effect of hypoxia on the expression of G6Pase has not been studied in crustaceans or other invertebrates, but it is known that in vertebrates species such as the fish *Sparus aurata* (Metón et al. 2004; Wang et al. 2015; Zhang et al. 2020) and in the stone crab *M. mercenaria* (Scholnick et al. 2006), starvation stress results in increased activity of the enzyme in the liver and hepatopancreas, respectively.

Fig. 3 Phylogenetic tree based in a multiple alignment of 25 G6Pase amino acid sequences from different species. Numbers show the percentages of support based on 1000 bootstraps steps. The scale bar equals 0.5 substitutions per site



Discussion

The analysis of enzymes involved in carbohydrate metabolism is essential to understand their regulation and physiological significance in different species. The enzymes that catalyze irreversible reactions in central metabolism are particularly interesting to comprehend the pathways and their regulators that provide vital physiological responses for the cells. In the white shrimp, the genes of four enzymes that catalyze irreversible reactions of glycolysis and the corresponding for gluconeogenesis have been identified: pyruvate carboxylase (PC) (our unpublished data), PEPCK (Reyes-Ramos et al. 2018), FBP (Cota-Ruiz et al. 2015) and herein we report the G6Pase sequence, a key enzyme involved in glucose homeostasis. To our best knowledge, this is the first detailed report of this gene in crustaceans.

There are three isozymes for G6Pase in vertebrates: G6Pase-I, G6Pase-II, and G6Pase-III (Hutton and O'Brien 2009); however, information about characterization, expression, and regulation of G6Pase genes is rather limited in invertebrates. The cDNA coding sequence was initially obtained from gills in our laboratory, and the complete gene sequence was experimentally determined from genomic DNA. When the genome sequence of *P. (L.) vannamei* was uploaded to the NCBI database (but not fully annotated),

the cDNA nucleotide sequence that we had determined was carefully compared to the genomic data and found the interrupted G6Pase gene sequence. Analysis of G6Pases genes from different species included in GenBank (not fully complete or annotated) showed that the exon–intron structure of the shrimp G6Pase is more similar to arthropods such as in the moth *Ostrinia furnacalis* (Gene ID: 114,364,740) and the silk moth *Bombyx mori* (Gene ID: 101,742,080) which contain seven exons interrupted by six introns, while most of the genes in mammals are composed of five or six coding exons. The shrimp gene shares the same size and position of the second and fourth coding exons of the above mentioned arthropods, likely due to their phylogenetic proximity, although the length of the introns and complete genes are different.

Even though the overall identity between the G6Pase proteins is not very high, the regions containing the catalytic amino acids are conserved (Ghosh et al. 2002; Metón et al. 2004). The G6Pase protein from *B. japonicum* has 20–40% identity with other G6Pases of different species, and this enzyme plays a key role in glucose homeostasis (Wang et al. 2015). The 358 amino acid shrimp G6Pase has the conserved phosphatases sequence motif PAP2 (KXXXXXXRP-(X12-54)-PSGH-(X31-54)-SRXXXXX HXXXX) characteristic of all G6Pases (Stukey and Carman 1997). Additionally,

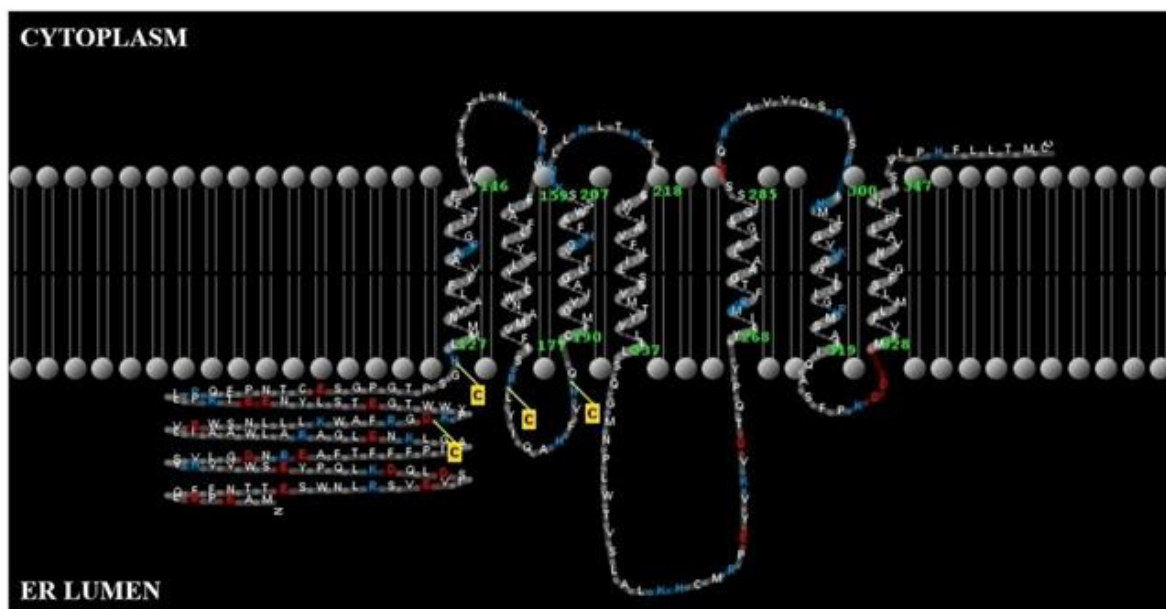


Fig. 4 Transmembrane topology prediction of *L. vannamei* G6Pase by HMMTOP server. The amino acids are coloring by electrostatic potential and the catalytic residues are indicated with C in yellow squares

the prediction of secondary structure based on hydropathy analysis using HMMTOP indicates the presence of transmembrane helices in G6Pase and coincides with homologs from vertebrates (Marcolongo et al. 2013), but the number of helices differs. The presence of seven TM helices separated by six hydrophilic loops in white shrimp G6Pase is presented in the model (Fig. 4).

In the phylogenetic analysis, the shrimp G6Pase is placed in the invertebrate group, with proximity only to the other shrimp species including the *M. nipponense* G6Pase and separated from the vertebrate sequences. It is worth noting that while isoforms in vertebrates can be grouped into different clades, in invertebrates there is no notable difference, indicating the higher proximity of G6Pases in this group. However, although the overall percentage of identity is low, there are highly conserved regions and the shrimp sequence is more similar to isoforms 1 and 2 of the fishes *Astyanax mexicanus* (30.72%), and *Chanos chanos* (30.52%) respectively.

In vertebrates, the liver is the central organ responsible for glucose homeostasis by *de novo* synthesis from non-carbohydrate precursors such as lactate or by hydrolysis of glycogen (Ghosh et al. 2002). In both metabolic pathways, the final reaction is catalyzed by G6Pase; therefore, this enzyme has been widely studied as an indicator of energy flow regulation, especially under stressful conditions such as starvation or under periods of high energy demand (Hah et al. 2002; Melkonian and Schury 2019).

Under optimal development conditions, little has been studied about G6Pase at a transcriptional level in invertebrates. However, in vertebrates as spotted gar, zebrafish, medaka, and rainbow trout, the liver is the main organ with the highest G6Pase expression compared to gills, muscle, kidney, demonstrating that it has a similar organ-specific expression pattern (Marandel et al. 2017). The same behavior was found in shrimp, indicating that hepatopancreas could be responsible for glycemic control in normoxia, coinciding with previous reports (Cervellione et al. 2017). Hence, it is possible that G6Pase functions as a good indicator of shrimp metabolic and physiological state.

In contrast, the expression of the gluconeogenic enzymes FBP and PEPCK is lower in the hepatopancreas compared to the muscle and the gills (Cota-Ruiz et al. 2015; Reyes-Ramos et al. 2018), which could indicate the activation of glycogenolysis instead of gluconeogenesis in this organ as a result of the fasting period to which the organisms were subjected (24 h at the sampling of this experiment). Consequently, the lack of energy substrates could induce the breakdown of the stored glycogen aiding to distribute glucose through the hemolymph to the target tissues for its use in the ATP rapid generation pathways as previously described, linking oxidative metabolism with the use and mobilization of carbohydrates between organs in shrimp (Sánchez-Paz et al. 2007; Ulaje et al. 2019). On the other hand, muscle and gills could play a secondary role in this metabolic process during normoxia, but it has been reported that G6Pase

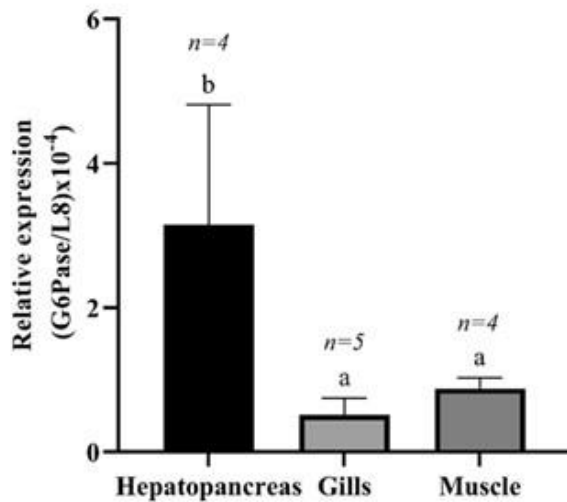


Fig. 5 Relative gene expression of G6Pase in white shrimp organs under normoxia. Data were normalized with the mRNA expression of the ribosomal protein L8 per the $2^{-\Delta C_t}$ method. Bars represent means $\pm$ SD. The differences between the treatments are represented by literals ($p < 0.05$). The n values are included for each group

activity in starvation increases in both organs (Thabrew et al. 1971; Mathew et al. 2007), which suggests a condition and organ-specific regulation of the glycemic control to compensate the stress suffered by the animals.

The studies about shrimp have shown a complex metabolic regulation system to resist different stressors. Until now, hypoxia has received ample interest since climate change and anthropogenic activities are affecting marine and shrimp farm waters. Carbohydrate metabolism enzymes and their genes appear to respond in a specific organ-condition manner as mentioned before. Hypoxia does not seem to affect G6Pase expression in the hepatopancreas in this study conditions. This could indicate that glucose synthesis in this organ is independent of oxygen deficiency-induced stress. Nevertheless, gluconeogenesis appears to be activated in crustaceans by prolonged hypoxia (Cota-Ruiz et al. 2015; Reyes-Ramos et al. 2018) or post-hypoxic recovery to synthesize glucose using the end products of anaerobic metabolism such as lactate as precursors (Hervant et al. 1999). Thus, we cannot discard the participation of other G6Pase isoforms involved in glucose homeostasis, as is known in mammals (Lord-Dufour et al. 2009). The expression of G6Pase in gills increased after 3 h and 24 h of hypoxia, suggesting that glucose is generated *de novo*; in contrast, the expression of FBP and PEPCK decreased (Cota-Ruiz et al. 2015; Reyes-Ramos et al. 2018), while the concentration of glucose and relative expression of its transporter increased (Martínez-Quintana et al. 2014, 2016) under similar stressful conditions, which could again indicate catabolism of

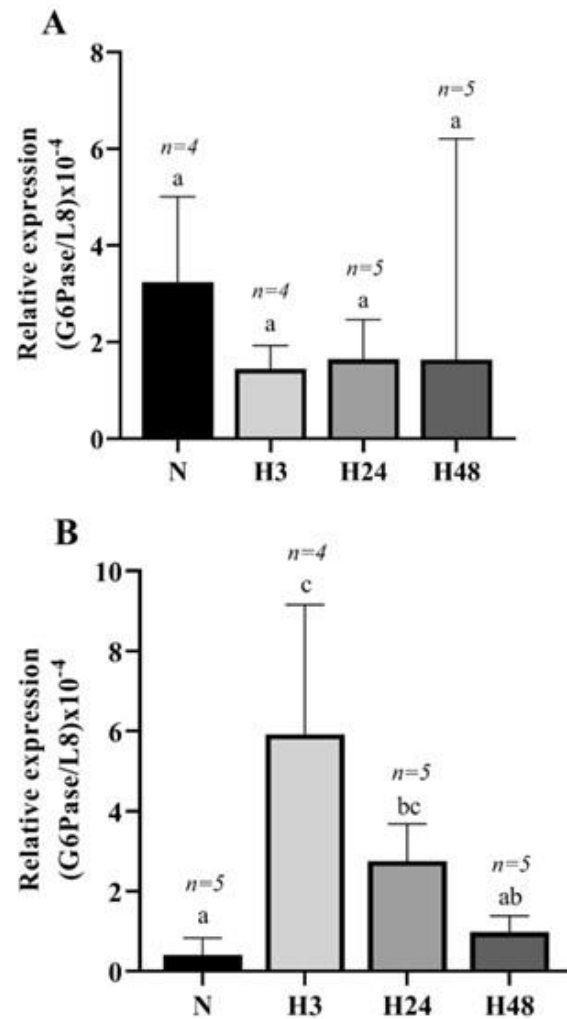


Fig. 6 Effect of hypoxia on G6Pase gene expression in hepatopancreas (A) and gills (B) of white shrimp. Data were normalized with the mRNA expression of the ribosomal protein L8 per the $2^{-\Delta C_t}$ method. N: control normoxia, H3: 3 h in hypoxia, H24: 24 h in hypoxia, H48: 48 h in hypoxia. Bars denote medians and ranges. The differences between the treatments are represented by literals ($p < 0.05$). The n values are included for each group

glycogen. Since it is known that crustaceans with different tolerance to hypoxia increase their hemolymph glucose and decrease their glycogen stores in the organs (Taylor and Spicer 1987), there is likely glycogenolysis activation in the white shrimp. It might be possible that gills exposed to low oxygen levels at the first exposed hours require additional energy vs other organs to perform essential processes such as respiration, detoxification, and osmotic regulation (Henry et al. 2012; Ulaje et al. 2019). Hence, G6Pase through glycogenolysis is generating enough glucose for the processes mentioned above.

Additionally, at 48 h of hypoxia in gills, the expression of G6Pase decreases, and it is reset at the level found in normoxia. Likewise, in this organ, the expression of FBP and PEPCK also decreases, which likely indicates that gluconeogenesis is not occurring, in contrast to the activation of gluconeogenesis in hepatopancreas that might occur at 48 h of hypoxia (Cota-Ruiz et al. 2015; Reyes-Ramos et al. 2018). This is probably the result of depression of metabolism (or hypometabolism) (Gorr et al. 2006) as a physiological strategy for the survival of shrimp to hypoxia to conserve energy through a coordinated decrease of the functions that mainly use ATP in the cell (for example, the synthesis and degradation of proteins) and prioritize essential and survival processes as mentioned above, to prevent lethal drops in cellular ATP levels. This could also be an indication of the synergistic regulation between gluconeogenesis and glycogenolysis not only as a glucose generation pathway to obtain fuel, but also as a strategy to take advantage of the carbon skeletons generated as lactate during anaerobic glycolysis.

Conclusions

This work reinforces the important role of the use and mobilization of carbohydrates in shrimp to survive and resist the low concentration of dissolved oxygen in different periods. The white shrimp G6Pase appears to contain all the necessary components of an active enzyme and the expression patterns in the three studied organs in normoxic and hypoxic conditions demonstrate its important role in glucose regulation probably mainly in gills by a glycogenolytic pathway in oxygen limited condition. Further research considering analysis of the promoter sequence, enzyme activity, and the implication of other G6Pase isoforms in response to different stressors in aquaculture will be helpful to the understanding of the physiological implications of this gene in these marine organisms.

Acknowledgements We are grateful for funding to CONACyT, Ciencia Básica grant A1-S-24557 to GYP. We thank Dr. Jorge L. Duarte-Gutiérrez, Dr. Dahlia M. Nuñez-Hernández, Biol. Adrian Gamez-Alejo, for technical help provided in the hypoxia bioassays.

Authors contributions LEHA performed experiments, data analysis and writing of original draft. KCR performed initial experiments and data analysis. SGJ, provided shrimp and bioassay facilities. ABPU supervised experiments and methodology, gave helpful suggestions, critically revised and approved the final manuscript. GYP conceived, designed and supervised the experiments, critically revised, edited and approved the final manuscript.

Funding This study was funded by the National Science and Technology Council, Mexico (CONACyT), grant Ciencia Básica A1-S-24557 to GYP and a scholarship for Ph.D studies to LEHA.

Data availability The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Declarations

Competing interests The authors declare no competing or financial interest.

References

- Altschul SF, Gish W, Miller W et al (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Arion WJ, Wallin BK, Lange AJ, Ballas LM (1975) On the involvement of a glucose 6-phosphate transport system in the function of microsomal glucose 6-phosphatase. *Mol Cell Biochem* 6:75–83
- Bostock J, McAndrew B, Richards R et al (2010) Aquaculture: Global status and trends. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 365:2897–2912
- Bradfield JY, Wyatt GR (1983) X-linkage of a vitellogenin gene in *Locusta migratoria*. *Chromosoma* 88:190–193. <https://doi.org/10.1007/BF00285619>
- Breathnach R, Benoist C, O'Hare K et al (1978) Ovalbumin gene: Evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:4853–4857. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.10.4853>
- Camacho-Jiménez L, Peregrino-Uriarte AB, Martínez-Quintana JA, Yepiz-Plascencia G (2018) The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Molecular cloning, characterization and expression during hypoxia. *Mar Environ Res* 138:65–75. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.04.003>
- Cervellione F, McGurk C, Van den Broeck W (2017) “Perigastric organ”: a replacement name for the “hepatopancreas” of Decapoda. *J Crustac Biol* 37:353–355. <https://doi.org/10.1093/jcibi/rux020>
- Cota-Ruiz K, Leyva-Carrillo L, Peregrino-Uriarte AB et al (2016) Role of HIF-1 on phosphofructokinase and fructose 1, 6-bisphosphatase expression during hypoxia in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comp Biochem Physiol -Part A Mol Integr Physiol* 198:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.03.015>
- Cota-Ruiz K, Peregrino-Uriarte AB, Felix-Portillo M et al (2015) Expression of fructose 1,6-bisphosphatase and phosphofructokinase is induced in hepatopancreas of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* by hypoxia. *Mar Environ Res* 106:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.02.003>
- Diaz RJ (2001) Overview of hypoxia around the world. *J Environ Qual* 30:275–281. <https://doi.org/10.2134/jeq2001.302275x>
- Ellington WR (1983) The recovery from anaerobic metabolism in invertebrates. *J Exp Zool* 228:431–444. <https://doi.org/10.1002/jez.1402280305>
- Ghaffari N, Sanchez-Flores A, Doan R et al (2014) Novel transcriptome assembly and improved annotation of the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), a dominant crustacean in global seafood mariculture. *Sci Rep* 4:1–10. <https://doi.org/10.1038/srep07081>
- Ghosh A, Shieh JJ, Pan CJ et al (2002) The catalytic center of glucose-6-phosphatase. HIS176 is the nucleophile forming the phosphohistidine-enzyme intermediate during catalysis. *J Biol Chem* 277:32837–32842. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201853200>
- Gorr TA, Gassmann M, Wappner P (2006) Sensing and responding to hypoxia via HIF in model invertebrates. *J Insect Physiol* 52:349–364

- Hah JS, Ryu J, Lee W et al (2002) The hepatocyte glucose-6-phosphatase subcomponent T3: Its relationship to GLUT2. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1564:198–206. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(02\)00450-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00450-9)
- Henry RP, Lucu C, Onken H, Weihrach D (2012) Multiple functions of the crustacean gill: Osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Front Physiol* 3 NOV:431. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00431>
- Hervant F, Garin D, Mathieu J, Freminet A (1999) Lactate metabolism and glucose turnover in the subterranean crustacean *Niphargus virei* during post-hypoxic recovery. *J Exp Biol* 202:579–592. <https://doi.org/10.1242/jeb.202.5.579>
- Hutton JC, O'Brien RM (2009) Glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene family. *J Biol Chem* 284:29241–29245
- Kumar S, Stecher G, Li M et al (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP et al (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- Le SQ, Gascuel O (2008) An improved general amino acid replacement matrix. *Mol Biol Evol* 25:1307–1320. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn067>
- Lord-Dufour S, Copland IB, Levros LC et al (2009) Evidence for transcriptional regulation of the glucose-6-phosphate transporter by HIF-1 α : Targeting G6PT with mumbaistatin analogs in hypoxic mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* 27:489–497. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0855>
- Loret SM, Devos PE (1992) Hydrolysis of G6P by a microsomal aspecific phosphatase and glucose phosphorylation by a low Km hexokinase in the digestive gland of the crab *Carcinus maenas*: variations during the moult cycle. *J Comp Physiol B* 162:651–657. <https://doi.org/10.1007/BF00296647>
- Marandel L, Panserat S, Plagnes-Juan E et al (2017) Evolutionary history of glucose-6-phosphatase encoding genes in vertebrate lineages: Towards a better understanding of the functions of multiple duplicates. *BMC Genomics* 18:342. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3727-1>
- Marcolongo P, Fulceri R, Gamberucci A et al (2013) Multiple roles of glucose-6-phosphatases in pathophysiology: State of the art and future trends. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1830:2608–2618
- Martínez-Quintana JA, Peregrino-Urriarte AB, Gollas-Galván T et al (2014) The glucose transporter 1 -GLUT1- from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* is up-regulated during hypoxia. *Mol Biol Rep* 41:7885–7898. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3682-8>
- Martínez-Quintana JA, Valenzuela-Soto EM, Martínez-Téllez MA et al (2016) Functionality of the white shrimp glucose transporter 1: Expression in *Xenopus oocytes* and gene silencing during hypoxia. *J Exp Mar Biol Ecol* 474:109–115. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.10.004>
- Mathew S, Nair AKK, Anandan R et al (2007) Biochemical studies on changes associated with enzymes of glucose metabolism in white spot syndrome virus (WSSV) infected with *Penaeus monodon* (Fabricius). *African J Biotechnol* 6:1944–1948. <https://doi.org/10.5897/ajb2007.000-2282>
- Melkonian EA, Schury MP (2019) Physiology. StatPearls Publishing, Glucconeogenesis
- Metón I, Caseras A, Fernández F, Baanante IV (2004) Molecular cloning of hepatic glucose-6-phosphatase catalytic subunit from gilt-head sea bream (*Sparus aurata*): Response of its mRNA levels and glucokinase expression to refeeding and diet composition. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol* 138:145–153. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.03.004>
- Pérez-Rostro CI, Racotta IS, Ibarra AM (2004) Decreased genetic variation in metabolic variables of *Litopenaeus vannamei* shrimp after exposure to acute hypoxia. *J Exp Mar Biol Ecol* 302:189–200. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2003.10.010>
- Reyes-Ramos CA, Peregrino-Urriarte AB, Cota-Ruiz K et al (2018) Phosphoenolpyruvate carboxykinase cytosolic and mitochondrial isoforms are expressed and active during hypoxia in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comp Biochem Physiol Part - B Biochem Mol Biol* 226:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2018.08.001>
- Sánchez-Paz A, García-Carreño F, Hernández-López J et al (2007) Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J Exp Mar Biol Ecol* 340:184–193. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.09.006>
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* 3:1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Scholnick DA, Barabas AE, Cowan SS (2006) The influence of chloride on glucose export in marine crabs: Sensitivity of glucose-6-phosphatase to chloride ion. *J Crustac Biol* 26:510–514. <https://doi.org/10.1651/S-2669a.1>
- Soñanez-Organis JG, Peregrino-Urriarte AB, Sotelo-Mundo RR et al (2011) Hexokinase from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: cDNA sequence, structural protein model and regulation via HIF-1 in response to hypoxia. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol* 158:242–249. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.12.006>
- Soñanez-Organis JG, Racotta IS, Yepiz-Plascencia G (2010) Silencing of the hypoxia inducible factor 1 -HIF-1- obliterates the effects of hypoxia on glucose and lactate concentrations in a tissue-specific manner in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J Exp Mar Biol Ecol* 393:51–58. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.06.031>
- Spyropoulos IC, Liakopoulos TD, Bagos PG, Hamodrakas SJ (2004) TMRPres2D: high quality visual representation of transmembrane protein models. *Bioinformatics* 20:3258–3260. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth358>
- Stukey J, Carman GM (1997) Identification of a novel phosphatase sequence motif. *Protein Sci* 6:469–472. <https://doi.org/10.1002/pro.5560060226>
- Surholt B, Newsholme EA (1981) Maximum activities and properties of glucose 6-phosphatase in muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem J* 198:621–629. <https://doi.org/10.1042/bj1980621>
- Taylor AC, Spicer II (1987) Metabolic responses of the prawns *Palaeomonetes elegans* and *P. serratus* (Crustacea: Decapoda) to acute hypoxia and anoxia. *Mar Biol* 95:521–530. <https://doi.org/10.1007/BF00393095>
- Thabrew MI, Poat PC, Munday KA (1971) Carbohydrate metabolism in *Carcinus maenas* gill tissue. *Comp Biochem Physiol - Part B Biochem* 40:531–541. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(71\)90238-0](https://doi.org/10.1016/0305-0491(71)90238-0)
- Trandaburu T (1977) Fine structural localization of glucose-6-phosphatase activity in the pancreatic islets of two amphibian species (*Salamandra salamandra* L. and *Rana esculenta* L.). *Acta Histochem* 59:246–253. [https://doi.org/10.1016/S0065-1281\(77\)80046-9](https://doi.org/10.1016/S0065-1281(77)80046-9)
- Trasviña-Arenas CH, García-Triana A, Peregrino-Urriarte AB, Yepiz-Plascencia G (2013) White shrimp *Litopenaeus vannamei* catalase: Gene structure, expression and activity under hypoxia and reoxygenation. *Comp Biochem Physiol Part - B Biochem Mol Biol* 164:44–52. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2012.10.004>
- Tusnady GE, Simon I (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* 17:849–850. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.9.849>
- Ulaje SA, Rojo-Arreola L, Lluch-Cota SE, et al (2019) Gene expression and energetic metabolism changes in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to short-term hypoxia. *Aquac Res* 50:are.13960. <https://doi.org/10.1111/are.13960>
- van Schaftingen E, Gerin I (2002) The glucose-6-phosphatase system. *Biochem J* 362:513–532. <https://doi.org/10.1042/bj3620513>

- Varga V, Murányi Z, Kurucz A et al (2019) Species-specific glucose-6-phosphatase activity in the small intestine—Studies in three different mammalian models. *Int J Mol Sci* 20:5039. <https://doi.org/10.3390/ijms20205039>
- Wang Y, Wang H, Li M et al (2015) Identification, expression and regulation of amphioxus G6Pase gene with an emphasis on origin of liver. *Gen Comp Endocrinol* 214:9–16. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.12.021>
- Wannamaker CM, Rice JA (2000) Effects of hypoxia on movements and behavior of selected estuarine organisms from the southeastern United States. *J Exp Mar Bio Ecol* 249:145–163. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(00\)00160-X](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(00)00160-X)
- Wu RSS (2002) Hypoxia: From molecular responses to ecosystem responses. *Mar Pollut Bull* 45:35–45. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00061-9](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00061-9)
- Zhang X, Yang Z, Deng D et al (2020) Effects of dietary starch levels on the growth, plasma metabolites and expression of genes involved in glucose transport and metabolism in *Pelodiscus sinensis* juveniles. *Aquac Res* 51:738–750. <https://doi.org/10.1111/arc.14424>
- Zhang X, Yuan J, Sun Y et al (2019) Penaeid shrimp genome provides insights into benthic adaptation and frequent molting. *Nat Commun* 10:1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08197-4>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**3. A SECOND ISOFORM OF PACIFIC WHITE SHRIMP GLUCOSE-6-PHOSPHATASE
(G6Pase2). ISOFORMS REGULATION VIA HIF-1 IN HYPOXIA AND
REOXYGENATION**

Hernández-Aguirre Laura E, Peregrino-Uriate Alma B, Duarte-Gutierrez Jorge L, Leyva-Carrillo
Lilia, Ezquerro-Brauer Josafat M, Valenzuela-Soto Elisa M, Yepiz-Plascencia Gloria

Artículo enviado a:

Journal of Bioenergetics and Biomembranes

Estatus: en revisión

1 **Shrimp Glucose-6-phosphatase 2 (G6Pase 2): A second isoform of G6Pase in the**
2 **Pacific white shrimp and regulation of G6Pase 1 and 2 isoforms *via* HIF-1 during**
3 **hypoxia and reoxygenation**

4 Laura E Hernández-Aguirre^a, Alma B. Peregrino-Uriarte^a, Jorge L. Duarte-Gutiérrez^a,
5 Lilia Leyva-Carrillo^a, Josafat M. Ezquerro-Brauer^b, Elisa M. Valenzuela-Soto^a, Gloria
6 Yepiz-Plascencia^{a*}

7

8 ^aCentro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), A.C, Carretera Gustavo
9 Enrique Astiazarán Rosas, no. 46, Col La Victoria, Hermosillo, Sonora, C.P. 83304,
10 México

11 ^bDepartamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora, Blvd
12 Luis Encinas y Rosales s/n, Hermosillo, Sonora, CP 83000, México

13 *Corresponding author. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD),
14 A.C, Hermosillo, Sonora, México. E-mail address: gyepiz@ciad.mx (G. Yepiz-
15 Plascencia)

16

17 **Abstract**

18 Animals suffer hypoxia when their oxygen consumption is larger than the oxygen available.
19 In water bodies, hypoxia affects the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*, both in
20 their natural habitat and in cultivation farms. Shrimp regulates some enzymes that participate
21 in energy production pathways as a strategy to survive during hypoxia. Glucose-6-
22 phosphatase (G6Pase) is key to maintain blood glucose homeostasis through gluconeogenesis
23 and glycogenolysis. We previously reported a shrimp G6Pase gene (G6Pase1) and in this
24 work, we report a second isoform that we named G6Pase2. The expression of the two
25 isoforms was evaluated in oxygen limited conditions and during silencing of the transcription
26 factor HIF-1. High G6Pase activity was detected in hepatopancreas followed by muscle and
27 gills under good oxygen and feeding conditions. Gene expression of both isoforms was
28 analyzed in normoxia, hypoxia and reoxygenation in hepatopancreas and gills, and in HIF-
29 1-silenced shrimp. In fed shrimp with normal dissolved oxygen (DO) (5.0 mg L⁻¹ DO) the
30 expression of G6Pase1 was detected in gills, but not in hepatopancreas or muscle, while
31 G6Pase2 expression was undetectable in all three tissues. In hepatopancreas, G6Pase1 is
32 induced at 3 and 48 h of hypoxia, while G6Pase2 is down-regulated in the same time points
33 but in reoxygenation, both due to the knock-down of HIF-1. In gills, only G6Pase1 was
34 detected, being induced by the silencing of HIF-1 only after 3 h of reoxygenation. Therefore,
35 the expression of the two isoforms appears to be regulated by HIF-1 at transcriptional level
36 in response to oxygen deprivation and subsequent recovery of oxygen levels.

37 **Keywords:** G6Pase2, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*, HIF-1, hypoxia, reoxygenation.

38

39 **Introduction**

40 Dissolved oxygen (DO) fluctuates in water bodies (Breitburg et al., 2018; Giraud-Billoud et
41 al., 2019). Low DO leads to hypoxia that can harm animals by accumulation of reactive
42 oxygen species (ROS). The recovery to normal oxygen conditions (reoxygenation) leads to
43 even more ROS production and can cause cellular damage. Therefore, animals develop
44 different strategies to survive and recover from these stressful conditions by compensatory
45 physiological responses to modulate their metabolism (Pérez-Rostro et al., 2004).

46 *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (*P. vannamei*), known as the Pacific white shrimp, is an
47 oxyregulator crustacean that adapts its oxygen consumption until a threshold, depending on
48 the available oxygen in its environment (Rosas et al., 1999). ATP production is halted during
49 oxygen limitations, but since some cells need to use only glucose as energy source, a shift in
50 several metabolic responses is driven by changes in anaerobic glycolysis and
51 gluconeogenesis enzymes in a tissue-specific manner to satisfy their energy requirements. In
52 vertebrate animals, the response at the transcriptional level occurs mainly by the hypoxia-
53 inducible factor HIF-1, also known as the master regulator of oxygen homeostasis. HIF-1 is
54 a heterodimer composed by HIF-1 α and HIF-1 β subunits, where HIF-1 α senses the oxygen
55 in the cell. In normoxia, the HIF-1 α subunit is hydroxylated and subsequently degraded in
56 the proteasome, but in hypoxia, it translocates to the nucleus to dimerize with the HIF-1 β
57 subunit and then, recognizes hypoxia response elements consensus sequences (HREs) that
58 are located in the promoter region of the regulated genes (Semenza, 2007). In shrimp, the
59 enzymes of glycolysis and anaerobic glycolysis, hexokinase (HK) (Soñanez-Organis et al.,
60 2011), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Camacho-Jiménez et al.,

2019) and lactate dehydrogenase (LDH) (Soñanez-Organis et al., 2012) are regulated *via* HIF-1 under different oxygenation conditions, indicating the participation of this regulator in the physiological response to obtain glucose for its distribution and assimilation in shrimp tissues.

In addition to the shrimp glycolysis enzymes above mentioned, the genes for the gluconeogenic enzymes fructose-1,6-bisphosphatase (FBP) (Cota-Ruiz et al., 2016), phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCK) (Reyes-Ramos et al., 2018), G6Pase (Hernández-Aguirre et al., 2021) and pyruvate carboxylase (PC) (Granillo-Luna et al., 2022) are differentially expressed during hypoxia, and although their HREs have as yet not been identified, it is very likely that these genes/enzymes play crucial roles in the production of glucose in low DO conditions. Then, during recovery from hypoxia (reoxygenation), the cellular processes such as the production of reactive oxygen species, replenishment of ATP, fuel reserves and pH maintenance also need to be restored to normal conditions, affecting the enzymes that participate in the different pathways (Chang and Thiel, 2015).

G6Pase is the last enzyme in gluconeogenesis and glycogenolysis, two metabolic pathways to generate glucose *de novo* from non-carbohydrate substrates or glycogen reserves, respectively, and plays an important role in glucose homeostasis. Previously, we identified a G6Pase in shrimp that is expressed in a tissue-specific manner and differentially affected by the time and the level of oxygenation exposure (Hernández-Aguirre et al., 2021). In this work, we report a second isoform that we named G6Pase2. We analyzed enzyme activity and gene expression response of both isoforms under different oxygenation conditions and also, we evaluated the role of HIF-1 using RNA interference to knock-down HIF-1 in hypoxia

83 challenged animals, with the aim to better understand the expression regulation that triggers
84 this kind of stressors.

85 **Materials and methods**

86 *G6Pase2 CDS and 5'-UTR cloning*

87 Total RNA was isolated from hepatopancreas of healthy juvenile shrimp using TRI® (Sigma-
88 Aldrich, San Luis, Missouri, USA) according to the manufacturer recommendations. To
89 remove possible trace amounts of genomic DNA, total RNA was treated with RNase-free
90 DNase I (Roche, Mannheim, Germany) and the RNA integrity was confirmed by 1% gel
91 agarose electrophoresis. Reverse transcription (RT) was performed with 750 µg of total RNA
92 and oligo dT (20 mer) using the Quantitect Reverse transcription system (Qiagen, Hilden,
93 Germany) to amplify the complete coding sequence (CDS). The GeneRacer kit (Invitrogen,
94 Carlsbad, CA) was used to obtain the 5'-UTR following the instructions of the manufacturer
95 for cDNA-RACE and using 3.5 µg of total RNA from hepatopancreas. The G6Pase2
96 sequence was obtained using primers designed based on the G6Pase *P. vannamei* sequences
97 available from the shrimp genome (Zhang et al., 2019) and transcriptome data (Ghaffari et
98 al., 2014). All the primers used in this work are listed in Table 1.

99 The G6Pase2 coding sequence (CDS) was obtained by PCR using G6P2F3/G6P2R3 primers
00 in a total reaction mix of 20 µL containing 10 µL Hot Start Taq 2x Master Mix (New England
01 BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA), 500 nM of each Fw and Rv primer, 6 µL milliQ
02 water, and 2 µL of cDNA (equivalent to 50 ng of total RNA) and was amplified under the
03 following conditions: 94 °C for 3 min, followed by 94 °C for 30 s, 55 °C for 1 min and 68

104 °C for 1 min and 40 s per cycle for 42 cycles and finally, 72 °C for 10 min in a PTC-200
105 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, California, USA). The 5'-UTR was amplified in two
106 separate reactions: the first reaction was in 30 µL reaction mix containing 15 µL Hot Start
107 Taq 2x Master Mix, 300 nM Gene Racer 5' primer, 100 nM G6P2R7 primer, 12.5 µL milliQ
108 water and 1 µL of cDNA-RACE amplified under the following conditions: 94 °C for 2 min,
109 followed by 5 cycles of 94 °C for 30 s, 72 °C for 2 min, 5 cycles of 94 °C for 30 s, 70 °C for
110 2 min, 25 cycles of 94 °C for 30 s, 67 °C for 30 s, 72 °C for 2 min, and finally 72 °C for 10
111 min. The second one was a nested PCR in 30 µL reaction mix containing 15 µL Hot Start
112 Taq 2x Master Mix, 200 nM Gene Racer 5' Nested primer, 200 nM G6P2R6 primer, 11.2 µL
113 milliQ water and 2 µL of the 1:5 diluted PCR product previously obtained, amplified under
114 the following conditions: 94 °C for 2 min, followed by 25 cycles of 94 °C for 30 s, 67 °C for
115 30 s and 72 °C for 2 min, with a final step of 72 °C for 10 min.

116 The PCR products were cloned in the pGEM-T Easy Vector System I (Promega, Madison,
117 WI, USA) and used to transform TOP10 *Escherichia coli* competent cells (Invitrogen,
118 Carlsbad, CA). Recombinant plasmids were sequenced by the dideoxy chain-termination
119 method at the Laboratory of Genomic Analysis and Technology Core of the University of
120 Arizona (Tucson, Arizona, USA). 5'-UTR and CDS G6Pase2 sequences and the deduced
121 protein were compared to nucleotide and protein GenBank databases using the BLAST
122 algorithm (Altschul et al., 1990) at the National Center for Biotechnology Information
123 (NCBI) (Bethesda, MD) and analyzed with ExPASy, Clustal Omega, and SnapGene
124 bioinformatics tools.

125 *Protein sequence analysis and structural 2D prediction of G6Pase isoforms*

126 For molecular weight and isoelectric point calculations, the ExPASy bioinformatic tool was
127 used (https://web.expasy.org/compute_pi/). Domains and conserved motives were searched
128 with the Pfam 32.0 tool (<https://pfam.xfam.org/>). The 2D structures of G6Pase1 and G6Pase2
129 isoform were compared using the new TMPDB, and the topological analysis was done in
130 CCTOP transmembrane topology prediction server (<http://cctop.ttk.hu/>) (Dobson et al.,
131 2015) and the models were constructed in TMRPres2D (Spyropoulos et al., 2004).

132 *Phylogenetic analysis of G6Pase2*

133 The phylogenetic tree was constructed with seventeen G6Pase protein sequences from
134 different organisms obtained from the NCBI database through BLASTp analysis (Table 2).
135 The alignment was conducted with the ClustalW algorithm and the phylogenetic analysis
136 was done with the Maximum Likelihood method, based on the Le Gascuel model (Le and
137 Gascuel, 2008) with 1000 bootstrap replicates using MEGA version 11 (Tamura et al., 2021).
138 All positions containing gaps and missing data were eliminated and the tree was rooted with
139 two G6Pases from *Haloferax gibbonsii* and *Haloarcula hispanica*.

140 *Normoxia, hypoxia, reoxygenation and HIF-1 α silencing bioassay*

141 Juvenile shrimp were used for the analysis to obtain sufficient amount of each tissue
142 individually. Also, because in their natural habitat, juveniles are usually found in estuaries,
143 coastal lagoons, and mangroves, that are areas of high fluctuation of environmental variables,
144 mainly oxygen and temperature. Two bioassays were done. The first one was conducted with
145 healthy juvenile shrimp in intermolt (12.12 ± 1.5 g) in filtered seawater (28 °C, 35‰), with

146 continual aeration ($5.0 \text{ mg L}^{-1} \text{ DO}$) that were fed three times a day with commercial feed (Api
147 Camaron® Raceways, 45% of protein). After two weeks of acclimatization, 10 shrimp were
148 separated to an independent 35 L aquaria to be constantly monitored under the same
149 conditions as in the acclimatization tank in normoxia ($5.79 \pm 0.45 \text{ mg L}^{-1} \text{ DO}$) for four days.
150 Shrimp were randomly collected and dissected to separate two aliquots of 50-100 mg for
151 hepatopancreas, gills, and muscle from each organism. One aliquot was immersed in ten
152 volumes (w/v) of TRIsure reagent (Bioline, London, UK) for total RNA isolation and the
153 other aliquot was placed in a microtube. Both aliquots were immediately frozen in a dry
154 ice/ethanol (96%) bath and subsequently kept at -80°C until processed. Animals were fed 2
155 h before sacrifice and only the normoxia condition was assessed in this bioassay.

156 The dsRNA synthesis and hypoxia, reoxygenation and HIF-1 α silencing bioassay with
157 juvenile shrimp ($14.27 \pm 1.10 \text{ g}$) was described in the previous study by Duarte-Gutiérrez et
158 al., (2021). Briefly, after two weeks of acclimatization, 160 apparently healthy shrimp were
159 distributed in groups of 10 organisms in 100 L aquarium to apply the following treatments:
160 a) 0 h of hypoxia (normoxia), b) 3 h of hypoxia, c) 3 h of hypoxia + 1 h of reoxygenation, d)
161 24 h of hypoxia, e) 24 h of hypoxia + 1 h of reoxygenation, and f) 48 h of hypoxia, g) 48 h
162 of hypoxia + 1 h of reoxygenation, with 2 aquaria for each treatment (one of them for dsRNA
163 injection silencing and the other injected with control saline solution) except for the normoxia
164 control at time 0 h (treatment a, which was injected only with saline solution), and a normoxia
165 control at each period challenge (HIF-1 silenced treatments h, i and j). For silencing of HIF-
166 1, the shrimp were injected intramuscularly with dsRNA. Each shrimp was injected with 14
167 μg of dsRNA of HIF-1 α diluted in 100 μL of saline solution (ss) (20 mM Tris, pH 7.5, 400
168 mM NaCl) or only ss to simulate the stress caused by the injection in non-silenced animals.

169 In this experiment a total of 16 conditions were evaluated. Normoxia, hypoxia, and hypoxia
170 + 1 h of reoxygenation treatments began 24 h after injection. Normoxia ($4.77 \pm 0.27 \text{ mg L}^{-1}$
171 DO) was maintained with constant bubbling of air through diffusing stones, while hypoxia
172 was achieved by bubbling nitrogen gas ($1.53 \pm 0.05 \text{ mg L}^{-1}$ DO). Reoxygenation was done
173 by slowly restoring the dissolved oxygen concentration for 1 h ($4.60 \pm 0.47 \text{ mg L}^{-1}$ DO). In
174 both bioassays the oxygen concentration was measured with an YSI Model ProODO
175 oximeter (Yellow Spring, OH, USA). After each challenge, 3 - 5 shrimp from each treatment
176 were sampled, starting with the normoxic control at 0 h.

177 *G6Pase isoforms expression and HIF-1 α silencing efficiency*

178 G6Pase1 and G6Pase2 relative expression by RT-qPCR, was evaluated in hepatopancreas,
179 gills and muscle in shrimp in normal conditions from the first bioassay in normoxia, and
180 under different oxygenation conditions (normoxia, hypoxia, and hypoxia + 1 h of
181 reoxygenation at 3, 24 and 48 h) and HIF-1 knock-down only in hepatopancreas and gills
182 from the second bioassay. As a template, cDNA equivalent to 25 – 100 ng of total RNA was
183 used as described above. The qG6PF2/qG6PR2 (307 bp amplicon) and qG6P2F5/qG6P2R4
184 (105 bp amplicon) primers were used to amplify the G6Pase1 and G6Pase2 transcripts,
185 respectively. The relative expression of G6Pase1 was done as described before in Hernández-
186 Aguirre et al., (2021), while G6Pase2 analysis was done in a final volume of 15 μL reaction
187 with 3 μL of 5x Hot FirePol EvaGreen (Solis BioDyne, Tartu, Estonia), 400 nM of each
188 primer, 10.4 μL of milliQ water and 1 μL of cDNA. The ribosomal protein L8 (GenBank
189 accession number DQ316258.1) was used as a reference gene to normalize the data
190 (previously validated as a good reference gene by Cota-Ruiz et al., (2015), and used in similar

191 studies by Camacho-Jiménez et al., (2018), and Duarte-Gutiérrez et al., (2021) and it was
192 quantified under the same conditions as G6Pase1 and G6Pase2 using 700 nM of each
193 L8F2/L8R2 primers (Trasviña-Arenas et al., 2013), to generate an amplicon of 166 bp. The
194 same standard curve was used in both genes with serial dilutions 1:5 of Hp cDNA (5×10^{-1} to
195 8×10^{-2} ng/ μ L).

196 HIF-1 α mRNA (GenBank accession number FJ807918) was quantified with the primers
197 HIFFJ2/HIFRJ2 (Duarte-Gutiérrez et al., 2021), in 15 μ L reactions containing 7.5 μ L of 2x
198 Sso Advanced universal SYBR® Green supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 580 nM
199 of each primer, 5.63 μ L of milliQ water and 1 μ L of cDNA (equivalent to 50 ng of total
200 RNA). The HIF-1 α standard curve was made with 1:10 serial dilutions of a purified PCR
201 product obtained with the same primers (5×10^{-4} to 5×10^{-8} ng/ μ L).

202 All reactions were performed in duplicate (2 PCR reactions for each cDNA and 2 cDNAs for
203 each shrimp) in a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) thermal cycler
204 with an initial cycle of 95 °C for 12 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, 60 °C for
205 20 s and 72 °C for 20 s for G6Pase2 and L8, and an initial cycle of 94 °C for 3 min, followed
206 by 40 cycles at 95 °C for 15 s, 60 °C for 35 s and 72 °C for 55 s for HIF-1 α . A denaturation
207 curve to check the specific amplification of each gene and ensure no dimers formation was
208 performed with a gradual increase in temperature of 0.5 °C/3 s from 65 °C to 95 °C. A non-
209 template control was included in each experiment to discard contamination. The
210 G6Pase1/L8, G6Pase2/L8 and HIF-1 α /L8 relative expression was calculated with $2^{-\Delta Ct}$
211 (Schmittgen and Livak, 2008) and the amplification efficiencies for each set of primers were
212 calculated from the standard curves, obtaining values between 90 and 110% (except for

213 G6Pase2 in the reoxygenation treatments without HIF-1 knock-down in hepatopancreas at 3,
214 24 and 48 h where the values of efficiency were between 88.6 and 116.7%). The silencing
215 efficiency was calculated by comparing the relative expression of the dsRNA treatment with
216 the ss treatment and expressed as a percentage.

217 *Isolation of the microsomal fraction and G6Pase activity*

218 Microsomal fractions and activity assay were done according to the microtechnique for the
219 analysis of the human hepatic glucose-6-phosphatase system described in Burchell et al.,
220 (1988) with some modifications. Approximately 100 mg of frozen tissue was homogenized
221 in 1:9 (w/v) of buffer A (250 mM sucrose, 5 mM HEPES, pH 7.4) containing 1 mM
222 phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) with a manual homogenizer Kontes (15 pulses of 2
223 sec) on ice for hepatopancreas, and sonication (5 cycles of 10 sec on/off with 40% amplitude,
224 30 duty cycle and 3 output control) for gills and muscle. The homogenate was centrifuged at
225 8,000 x g for 6 min at 4 °C and the resulting supernatant was recentrifuged in a 10 mL
226 polypropylene tube at 38,000 x g for 166 min at 4 °C in a Beckman Avanti 30 Centrifuge
227 (Beckman Coulter, Indianapolis US). The pellet containing the microsomes was resuspended
228 in 2 mL of buffer A per mg of wet weight and then divided into aliquots and frozen at -80 °C
229 until the assays.

230 The glucose-6-phosphatase activity assay was performed in microsomal extracts of
231 hepatopancreas, gills and muscle for 10 minutes at 30 °C in 40 µL of reaction volume. The
232 quantification of the inorganic phosphate (Pi) produced was conducted with the combination
233 of the methods described in Burchell et al., (1988) and Wallert et al., (2001) adapted to
234 microplates. Standard curve was prepared in the range 1.25 to 18.75 nmol of Pi (using 0.5

235 mM KH_2PO_4 stock containing 50 mM sodium cacodylate buffer, pH 6.5). The assay was
236 initiated by adding 8 μL of the previously diluted microsome suspension (1:10 final dilution)
237 to 32 μL of assay buffer (50 mM sodium cacodylate buffer, pH 6.5, 2 mM EDTA and 5 mM
238 glucose-6-phosphate as substrate) previously equilibrated at 30 °C for 5 min. The reaction
239 was stopped after 10 min by the addition of 160 μL of the stop reagent prepared in fresh with
240 the combination of solutions B (3.4 mM ammonium molybdate in 0.5 M sulfuric acid), C
241 (0.52 M sodium dodecyl sulphate in water) and D (0.6 M ascorbic acid in water prepared in
242 fresh) in the proportion 6:2:1, respectively. After incubation for 20 min at 45 °C, the
243 absorbance of the phosphate-molybdate complex was determined by triplicate at 820 nm
244 using the Multiskan Sky microplate reader (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts US). A
245 blank without microsomal extract was included and one reaction with 0.004 U of glucose-6-
246 phosphatase from rabbit liver (Sigma-Aldrich) diluted in 50 mM sodium cacodylate buffer,
247 pH 6.5, as positive control. A reading was made at time 0 of incubation for each sample in
248 parallel to calculate the nanomoles of Pi formed during the 10 min of the assay. G6Pase
249 activity is reported as nmoles of phosphate hydrolyzed per minute per mg of microsomal
250 protein. Total microsomal protein to normalize the Pi detected was determined by the
251 Bradford method (Bradford, 1976). Since the activity measurements are performed on intact
252 vesicles with selective permeability of the substrate + disrupted vesicles without selective
253 permeability (the enzyme has free access to substrates and inhibitors), the latency of the
254 samples was calculated, which indicates the activity in the disrupted microsomal preparations
255 that it is not manifest in intact microsomal preparations. Percentage of latency was evaluated
256 in each organ according to Arion (1989) with microsome samples treated and untreated with

257 0.1 % of Triton X-100 during 20 min at 0 °C. The enzyme assay was performed as described
258 above using 2 mM manose-6-phosphate as substrate.

259 *Statistics*

260 The Shapiro-Wilk and Levene tests were used to verify the assumptions of normality and
261 homoscedasticity, respectively. Relative expression data of G6Pase isoforms and HIF-1 α
262 were analyzed by one-way ANOVA and Fisher LSD mean comparison, whereas the effect
263 of the silencing was assessed by two-sample T-Test with $p < 0.05$ in all cases. Data are
264 presented in means $\pm$ standard error.

265 **Results**

266 *5'-UTR and CDS of the G6Pase2*

267 The G6Pase2 mRNA sequence is 1160 bp long (**Fig. 1**), with a 5'-UTR of 74 bp and 1086
268 bp coding sequence corresponding to the 361 amino acid protein with theoretical isoelectric
269 point and molecular weight of 9.84 and 40.58 kDa, respectively. The R, H, R and H catalytic
270 amino acids were identified and the Pfam 32.0 analysis revealed that G6Pase2 has the PAP2-
271 glucose-6-phosphatase domain characteristic of all G6Pase proteins. The nucleotidic
272 sequence was submitted to GenBank, accession number OP377076.

273 *G6Pase2 protein*

274 BLAST analysis of the protein showed an identity of 34.13% with our previously identified
275 shrimp isoform and now named G6Pase1 (GenBank accession number UJO02151.1), but
276 more than 60% identity was found with the homologous proteins of the crustaceans
277 *Macrobrachium nipponense* (66.2%, GenBank accession number ALK82315.1), *Homarus*

278 *americanus* (68.98% GenBank accession number XP_042217107.1), *Penaeus japonicus*
 279 (92.24% GenBank accession number XP_042855681.1), and *Penaeus chinensis* (95.01%
 280 GenBank accession number XP_047474896.1), except with the water flea *Daphnia magna*
 281 (GenBank accession number KZS17548.1) and the isoform 1 from the human (GenBank
 282 accession number P35575) with just 39.04 and 31.27% identity, respectively, with this
 283 human homolog, the most studied isoform in mammals (**Fig. 2**). All the catalytic amino acids
 284 were clearly identified with 100% conservation in the analyzed proteins.

285 *G6Pase1 and G6Pase2 topological model and phylogenetic analysis*

286 The hypothetical topological model of G6Pase1 constructed with CCTOP predicts 8
 287 transmembrane helices with four loops oriented towards the endoplasmic reticulum (ER)
 288 lumen, and three loops, and the N and C terminal protein ends oriented towards the
 289 cytoplasm. On the other hand, 9 transmembrane helices are predicted in G6Pase2, with four
 290 loops and the N terminal protein end oriented towards the ER lumen, and four loops with the
 291 C terminal protein end oriented towards the cytoplasm. The orientation of the catalytic amino
 292 acids in the two isoforms are predicted towards the ER lumen. Both shrimp isoforms models
 293 were compared with the human G6Pase1 (TOPDB access number AP02110) and G6Pase2
 294 (TOPDB access number AP02336) as cross-reference respectively, and the reliability of
 295 topology was 75.829% for G6Pase1 and 76.442% for G6Pase2 (**Fig. 3**). Phylogenetic
 296 analysis places *P. vannamei* G6Pase2 in an independent clade together with the G6Pase
 297 isoforms from another crustaceans, including the G6Pase1 before studied; however, there is
 298 also a close phylogenetic relationship with other arthropods such as the mite *Tetranychus*
 299 *urticae*, the ticks *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor andersoni* (bootstrap value 29),
 300 with a clear separation to clades from vertebrate organisms (**Fig. 4**).

301 *G6Pase isoforms expression and total G6Pase activity in shrimp tissues in normoxia*

302 To compare the expression of G6Pase1 and G6Pase2 and total activity in different shrimp
303 tissues in fed animals and in normoxia, transcripts abundance was measured by RT-qPCR
304 and the activity in microsomal extracts. The expression of G6Pase1 was detected in gills, but
305 was undetectable under the conditions tested in hepatopancreas and muscle (cDNA
306 equivalent to 25 ng/ μ L of total RNA). However, there was G6Pase activity in the three
307 tissues, with higher activity in hepatopancreas ($p < 0.05$) followed by muscle and gills under
308 the same conditions (**Fig. 5**). The percentage of latency calculated in gills was 41.50, but it
309 was not possible to calculate the same parameter in hepatopancreas and muscle samples.

310 *HIF-1 α silencing in normoxia, hypoxia and hypoxia plus reoxygenation in hepatopancreas*

311 HIF-1 α silencing was analyzed in samples from the different oxygenation conditions in
312 hepatopancreas (**Fig. 6**). The expression of this transcription factor in shrimp injected with
313 dsRNA *vs* controls injected with ss showed a significant decrease of HIF-1 α mRNA
314 abundance at 3, 24 and 48 h of normoxia, hypoxia and hypoxia plus 1 h of reoxygenation (p
315 < 0.05), as well in normoxia compared to the control at time 0 h in each time evaluated. The
316 silencing percentages were calculated by comparing the averages of the relative expression
317 of the silenced *versus* the non-silenced treatments. The data showed silencing percentages
318 larger than 50% in all the treatments evaluated in hepatopancreas (Table 3), as previous
319 studies showed in gills under the same conditions tested (Camacho-Jiménez et al., 2019).

320 *Effect of HIF-1 knock-down on G6Pase1 and G6Pase2 expression in shrimp hepatopancreas*
321 *under different oxygenation conditions*

322 To evaluate the HIF-1 silencing effect on the G6Pase isoforms in hepatopancreas, we
323 analyzed the expression in shrimp subjected to different oxygenation conditions (normoxia,
324 hypoxia and hypoxia plus 1 h of reoxygenation) at 3, 24 and 48 h by RT-qPCR as shown in
325 Figure 7. G6Pase1 increased in shrimp injected with dsRNA after 3 and 48 h of hypoxia
326 compared to normoxia control at 0 h ($p < 0.05$). Due to the low abundance of this isoform, it
327 was undetectable in reoxygenation at the same time condition, as in silenced shrimp at 3 h
328 and 24 h in normoxia. In normoxia, only after 48 h in knock-down shrimp, G6Pase1 was
329 induced compared to 0 h control treatment ($p < 0.05$). In the dsRNA injected shrimp at 24 h
330 of hypoxia, the transcript was undetected, however, an increased expression was detected in
331 hypoxia plus 1 h of reoxygenation ($p < 0.05$), although there was no silencing effect (**Fig.**
332 **7A**).

333 HIF-1 silencing effect on G6Pase2 expression contrasts to G6Pase1. In non-silenced shrimp
334 after 3 h of hypoxia and 3 h and 48 h of hypoxia plus 1 h of reoxygenation, as well as in
335 knock-down shrimp at 24 h in normoxia, the expression increased compared to the 0 h control
336 ($p < 0.05$). Only after 3 and 48 hours in hypoxia plus 1 h of reoxygenation, a statistically
337 significant effect of HIF-1 silencing was detected with lower G6Pase2 expression ($p < 0.05$)
338 (**Fig. 7B**).

339 *Effect of HIF-1 knock-down on G6Pase1 and G6Pase2 expression in shrimp gills under*
340 *different oxygenation conditions*

341 The expression patterns of both isoforms also were analyzed to detect the effect of HIF-1
342 silencing in gills. While no expression of G6Pase2 was detected under any of the conditions
343 tested in this tissue, changes in the expression levels of G6Pase1 were successfully detected.
344 Compared to the control group in normoxia at 0 h, this isoform was induced in all treatments
345 at 3 and 24 h, as well as in normoxia and hypoxia plus 1 h of reoxygenation in the knock-
346 down shrimp at 48 h. No effect of silencing on G6Pase1 expression was identified after 24
347 and 48 h of hypoxia and hypoxia plus 1 h of reoxygenation. However, injection with dsRNA
348 decreases G6Pase1 mRNA in hypoxia with a pronounced tendency and induces expression
349 after 3 h hypoxia plus 1 h of reoxygenation ($p < 0.05$) (**Fig. 7C**).

350 **Discussion**

351 *G6Pase2 isoform of P. vannamei*

352 G6Pase is a key enzyme involved in the regulation of glucose homeostasis. There are three
353 G6Pase isozymes in vertebrates: G6Pase-I, G6Pase-II and G6Pase-III (Hutton and O'Brien,
354 2009), but little is known about these enzymes in invertebrate organisms, therefore it is
355 necessary to obtain more information to understand their characteristics and modulations of
356 specific activities and regulation.

357 We previously identified the presence of one isoform of G6Pase in shrimp (which we now
358 named in this study as G6Pase1) (Hernández-Aguirre et al., 2021), and here we analyzed a
359 second isoform (named G6Pase2). Although we obtained a fragment of 419 bp for the

360 G6Pase2 gene (data not shown), the full-length gene sequence was not obtained due to its
361 size. By *in silico* search of the G6Pase2 gene in the shrimp genome published in the NCBI
362 database (Zhang et al., 2019), very long introns (above 9,000 bp) and microsatellites-rich
363 regions included in the gene sequence were identified. Thus, this isoform appears to be more
364 complex than G6Pase1 and therefore the whole gene sequence is more difficult to obtain
365 experimentally.

366 The G6Pase2 nucleotide sequence contains 74 bp upstream of the Met start codon
367 corresponding to the 5'-UTR. The CDS and the deduced protein have a similar size to the
368 first isoform described in shrimp and to those reported in other organisms of different phyla,
369 with all the catalytic amino acids conserved (Ghosh et al., 2002). There is a big difference in
370 the primary protein structure of the two shrimp G6Pases sequences, sharing only 34.13%
371 identity, with more identities to others crustacean homologs (more than 95% with the shrimp
372 *Penaeus chinensis*). The low identity among G6Pase isoforms in the same species is a very
373 common characteristic. For example, human G6Pase proteins share 50.8% of identity
374 between G6Pase1 and G6Pase2 and 35.6% between G6Pase1 and G6Pase3 and this also
375 occurs in mouse and milkfish isoforms; nonetheless, the proteins retain their glucose-6-
376 phosphate dephosphorylation function (Wang et al., 2015). The deduced 361 amino acids of
377 the G6Pase2 protein have the conserved phosphatases sequence motif PAP2
378 (KXXXXXXXXRP-(X12-54)-PSGH-(X31-54)-SRXXXXX HXXXD) characteristic of all
379 G6Pases isoforms (Stukey and Carman, 1997), and this likely indicates that the shrimp
380 G6Pase2 is indeed a functional protein.

381 The topological structure model of the protein indicates the presence of 9 transmembrane
382 helices in G6Pase2 compared to the 7 helices predicted for G6Pase1 using HMMTOP server
383 and previously reported (Hernández-Aguirre et al., 2021). In this work, the topological
384 analysis of G6Pase1 was done again using the updated CCTOP server, and now 8
385 transmembrane helices were predicted. To the best of our knowledge, there are no resolved
386 topological or three-dimensional structures of G6Pases in crustaceans, however, and despite
387 the differences between the amino acid sequences, the topological structures of human
388 G6Pases were used as a cross-reference to build the models of the shrimp isoforms with
389 success, obtaining more than 75% of reliability. These differences probably confer to each
390 isoform different regulatory mechanisms that provide larger metabolic plasticity to shrimp
391 under different environmental conditions, as will be described later. The phylogenetic
392 analysis showed the grouping of the shrimp G6Pases in the crustacean's clade and it was
393 evident that between isoenzymes, there are less differences compared to vertebrates.

394 *G6Pase activity and isoforms relative expression in shrimp under normal conditions*

395 The activity of G6Pase in the three tissues showed similar patterns to the ones reported in the
396 burrowing semiterrestrial crab (*Neohelice granulata*) (Martins et al., 2011) and in the stone
397 crab (*Menippe mercenaria*) (Scholnick et al., 2006) under normal conditions, wherein
398 hepatopancreas exhibit larger activity followed by other tissues such as gills and claw muscle.
399 Hepatopancreas is a highly metabolic organ considered the main source of endogenous
400 glucose production (Chang and Thiel, 2015), and since G6Pase participates in this metabolic
401 process, it is expected that the enzyme will play a similar role in shrimp.

402 On the other hand, G6Pase1 and G6Pase2 transcripts were undetectable under normoxic
403 conditions, except for G6Pase1 in gills. We previously reported that G6Pase1 mRNA is
404 present in all three tissues in normoxia in 24-hour fasted shrimp (Hernández-Aguirre et al.,
405 2021) compared to a 2-hour fasted from the organisms in this study, indicating that feeding
406 affects expression of the G6Pase isoforms, as noted in vertebrates and invertebrates and that
407 their regulation in response to feeding, involves several transcription factors/co-regulators
408 (Jitrapakdee, 2012; Zhang et al., 2021).

409 The detection of enzymatic activity despite the low abundance of G6Pase1 and G6Pase2
410 transcripts in hepatopancreas and muscle, and G6Pase2 in gills, probably indicates that under
411 normoxic conditions the enzyme is synthesized and is present at a basal level even though in
412 the cell the expression is down-regulated, since there is no trigger response to the lack of fuel
413 to produce ATP. On the other hand, since G6Pase1 is present in gills, it could be up-regulated
414 at the transcriptional level displaying an important role under normoxia. Besides the
415 respiratory function, gills of decapod crustaceans also have an ion/osmoregulatory function
416 that demand high energy usage and thus, high energy metabolism (Thabrew et al., 1971). In
417 *Carcinus maenas*, glycogen is the main source of energy available for several gills function
418 (posterior gills) (Chausson and Regnault, 1995). In *N. granulata* there is higher activity of
419 G6Pase, FBP and PEPCK in the posterior gills under hyperosmotic stress, indicating the
420 activation of gluconeogenesis (Martins et al., 2011). Therefore, in *P. vannamei*, G6Pase1
421 could perform this function in gills through gluconeogenesis and glycogenolysis regulated at
422 the transcriptional level in normoxia.

423 *HIF-1 regulates G6Pase isoforms expression in hepatopancreas and gills under different*
424 *oxygenation conditions*

425 Interference RNA (RNAi) has been widely used in shrimp to study the role of several genes
426 involved in the physiological response to stressful conditions. In this work, our objective was
427 to evaluate the role of HIF-1 in the expression of G6Pase isoforms when shrimp are under
428 hypoxia and reoxygenation. Knock-down of HIF-1 in hepatopancreas was statistically
429 significant and comparable to previous reports in the same tissue (34 - 82%) (Cota-Ruiz et
430 al., 2016), in hemocytes (65 - 93%) (Duarte-Gutiérrez et al., 2021) and in gills (~ 86%)
431 (Soñanez-Organis et al., 2010), (43 - 93%) (Camacho-Jiménez et al., 2019), where the
432 silencing of this transcription factor by intramuscular injection of dsRNA influenced the
433 expression of PFK, FBP, metallothionein and GAPDH in shrimp, respectively. In the present
434 study an effective silencing of HIF-1 α was obtained, which allowed us to continue with the
435 evaluation of the effect of its silencing on G6Pase.

436 The tissue, the DO condition and the exposure time influence the expression of both isoforms,
437 and HIF-1 seems to contribute to the responses. In general, the largest HIF-1 α knock-down
438 effect is noted in the first hours of stress. Although it was not expected, induction of
439 expression in the silenced treatments is mostly detected in the G6Pase1 isoform in
440 hepatopancreas in hypoxia for 3 and 48 h, and in reoxygenation in gills at 3 h. Also, that
441 induction was seen in normoxia from dsRNA injected shrimp. In many studies, the decrease
442 of HIF-1 transcripts produces a contrary effect, since it is a transcription activator, just as
443 seen in G6Pase2 in hepatopancreas. This is not the first report showing this contrasting
444 results, since in expression of GAPDH in normoxia, the silencing of HIF-1 using the same

445 RNAi approach produced an increase (Camacho-Jiménez et al., 2019), and higher lactate and
446 glucose metabolites (Soñanez-Organis et al., 2010), showing that HIF-1 is involved in the
447 regulation of carbohydrate metabolism regardless of the stress to which the organism may be
448 subjected, and possibly the activation of alternate signaling pathways triggered also by the
449 silencing of HIF-1 (Camacho-Jiménez et al., 2019). In mouse embryonic fibroblasts (MEFs),
450 the transcriptional repressor DEC1/Stra13 acts as an effector of HIF-1 in hypoxia to repress
451 the nuclear receptor PPAR γ 2 involved in cell differentiation, causing inhibition of
452 adipogenesis (Yun et al., 2002), therefore, the negative regulation *via* HIF-1 in hypoxia does
453 indeed occur in vertebrates, however, this type of information needs to be analyzed with
454 caution in shrimp.

455 The most evident effect of down-regulation by the silencing of HIF-1 α was in G6Pase2 after
456 3 h of hypoxia and reoxygenation, and after 48 h and reoxygenation in hepatopancreas (only
457 statistically significant in reoxygenation but with a clear trend in hypoxia), showing the drop
458 of the transcript abundance and denoting the regulatory influence of HIF-1 on the induction
459 of the G6Pase2 isoform. These results agree with the expression of the glycolytic and
460 gluconeogenic enzyme GAPDH, regulated in a similar manner, since after the HIF-1 dsRNA
461 injection in hypoxia and reoxygenation at 3 h its transcript was reduced (Camacho-Jiménez
462 et al., 2019). Thus, there could be an early induction of the expression of both isoforms in a
463 tissue-specific manner in shrimp under hypoxic conditions and that is maintained during
464 reoxygenation. The relative expression in normoxia of G6Pase2, indicated that it is specific
465 for hepatopancreas, since it was not detected in gills and muscle (data not shown). This also
466 occurs in other organisms, for example, in the fish Chinese perch (*Siniperca chuatsi*), where
467 the *g6pca* and *g6pcb1* isoforms are expressed mainly in liver, compared to the *g6pc3* isoform,

468 that is more abundant in gills (Zhang et al., 2021), indicating that the isoforms of G6Pase are
469 expressed in a tissue-specific manner.

470 As mentioned before, G6Pase1 in gills could contribute to the generation of glucose *de novo*
471 as a survival strategy to supply energy to increase the ventilation rate, and G6Pase2 in
472 hepatopancreas to maintain glucose homeostasis with its distribution through the
473 hemolymph, necessary in these oxyregulator organisms (Lord-Dufour et al., 2009). This
474 might be given by the glycogenolytic pathway since it is known that gluconeogenic enzymes
475 are mainly expressed in prolonged times of exposure of stress in shrimp (Cota-Ruiz et al.,
476 2015; Reyes-Ramos et al., 2018).

477 **Conclusions**

478 The adaptive mechanisms that crustaceans use to survive changes in oxygenation conditions
479 in their habitat, include the regulation of metabolic pathways to produce glucose as a source
480 of ATP, for the restoration of glycogen reserves or maintain glucose homeostasis in
481 hemolymph. Here we provide evidence of the presence of two isoforms of G6Pase in shrimp,
482 an enzyme that participates in these processes. While G6Pase1 is mainly expressed in gills,
483 G6Pase2 is specific for hepatopancreas. This, together with the time-dependent expression
484 patterns detected and the conditions evaluated, indicates that both proteins contribute to these
485 responses in hypoxia, reoxygenation and even in normal growth conditions for shrimp. This
486 study contributes to the understanding of the complex regulatory machinery that is activated
487 as a result of abiotic stress.

488 **Authors contributions**

489 LEHA performed the experiments, data analysis and writing of original draft. JDG performed
490 the HIF-1 silencing bioassay. ABPU supervised gene expression experiments and
491 methodology, gave helpful suggestions, critically revised and approved the final manuscript.
492 LLC and EVS helped with the enzyme activity assays, MEB supervised the statistical
493 analysis. GYP conceived, designed and supervised the experiments, critically revised, edited
494 and approved the final manuscript.

495

496 **Ethics approval**

497 The shrimp bioassay done in this study did not require an ethical approval for animal
498 handling. The bioassay facility laboratory is certified by EMA (Entidad Mexicana de
499 Acreditación) SA-0758-030/16 to perform marine animal tests.

500

501 **Funding**

502 This study was funded by the National Science and Technology Council, Mexico
503 (CONACyT), grant Ciencia Básica A1-S-24557 to GYP and a scholarship for Ph.D studies
504 to LEHA.

505 **Acknowledgements**

506 We are grateful for funding to CONACyT, Ciencia Básica grant A1-S-24557 to GYP, and
507 for Ph.D. studies to LEHA. We thank Dr. S. Gómez-Jiménez, Biologists A. Gamez-Alejo,
508 M.C.J. Zamorano-Apodaca of the Marine Invertebrates Physiology Laboratory of CIAD for
509 technical help provided in the hypoxia bioassays.

510 **Declarations**

511 Competing interests. The authors declare no competing or financial interest.

512

513 **References**

514 Altschul SF, Gish W, Miller W, et al (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*
515 215:403 - 410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

516 Arion WJ (1989) [7] Measurement of intactness of rat liver endoplasmic reticulum. In:
517 Methods in Enzymology. Academic Press, pp 58–67

518 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
519 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*
520 72:248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

521 Breitburg D, Levin LA, Oschlies A, et al (2018) Declining oxygen in the global ocean and
522 coastal waters. *Science* 359:eaam7240. <https://doi.org/10.1126/science.aam7240>

523 Burchell A, Hume R, Burchell B (1988) A new microtechnique for the analysis of the human
524 hepatic microsomal glucose-6-phosphatase system. *Clinica Chimica Acta* 173:183–191.
525 [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(88\)90256-2](https://doi.org/10.1016/0009-8981(88)90256-2)

526 Camacho-Jiménez L, Leyva-Carrillo L, Peregrino-Uriarte AB, et al (2019) Regulation of
527 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by hypoxia inducible factor 1 in the white
528 shrimp *Litopenaeus vannamei* during hypoxia and reoxygenation. *Comp Biochem Physiol,*
529 Part A Mol Integr Physiol 235:56–65. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.05.006>

530 Camacho-Jiménez L, Peregrino-Uriarte AB, Martínez-Quintana JA, Yepiz-Plascencia G
531 (2018) The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of the shrimp *Litopenaeus*
532 *vannamei*: Molecular cloning, characterization and expression during hypoxia. *Mar*
533 *Environ Res* 138:65–75. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.04.003>

534 Chang ES, Thiel M (2015) The natural history of the crustacea. Oxford University Press,
535 United States of America, pp 391–419

536 Chausson F, Regnault M (1995) Teneur en glycogène des branchies de *Carcinus maenas*
537 (Crustacé, Décapode): Comparaison entre branchies antérieures et postérieures. *Cah Biol*
538 Mar 36:291–297

539 Cota-Ruiz K, Leyva-Carrillo L, Peregrino-Uriarte AB, et al (2016) Role of HIF-1 on
540 phosphofructokinase and fructose 1, 6-bisphosphatase expression during hypoxia in the

541 white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comp Biochem Physiol, Part A Mol Integr Physiol*
542 198:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.03.015>

543 Cota-Ruiz K, Peregrino-Uriarte AB, Felix-Portillo M, et al (2015) Expression of fructose
544 1,6-bisphosphatase and phosphofructokinase is induced in hepatopancreas of the white
545 shrimp *Litopenaeus vannamei* by hypoxia. *Mar Environ Res* 106:1–9.
546 <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.02.003>

547 Dobson L, Reményi I, Tusnády GE (2015) CCTOP: a Consensus Constrained TOPology
548 prediction web server. *Nucleic Acids Res* 43: W408–W412.
549 <https://doi.org/10.1093/nar/gkv451>

550 Duarte-Gutiérrez J, Peregrino-Uriarte AB, Gómez-Jiménez S, et al (2021) HIF-1 is involved
551 in the regulation of expression of metallothionein and apoptosis incidence in different oxygen
552 conditions in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comp Biochem Physiol, Part A Mol*
553 *Integr Physiol* 262:111072. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.111072>

554 Ghaffari N, Sanchez-Flores A, Doan R, et al (2014) Novel transcriptome assembly and
555 improved annotation of the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), a dominant crustacean
556 in global seafood mariculture. *Sci Rep* 4:7081. <https://doi.org/10.1038/srep07081>

557 Ghosh A, Shieh JJ, Pan CJ, et al (2002) The catalytic center of glucose-6-phosphatase
558 HIS176 is the nucleophile forming the phosphohistidine-enzyme intermediate during
559 catalysis. *J Biol Chem* 277:32837–32842. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201853200>

560 Giraud-Billoud M, Rivera-Ingraham GA, Moreira DC, et al (2019) Twenty years of the
561 ‘Preparation for Oxidative Stress’ (POS) theory: Ecophysiological advantages and molecular
562 strategies. *Comp Biochem Physiol, Part A Mol Integr Physiol* 234:36–49.
563 <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.04.004>

564 Granillo-Luna ON, Hernandez-Aguirre LE, Peregrino-Uriarte AB, et al (2022) The
565 anaplerotic pyruvate carboxylase from white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Gene structure,
566 molecular characterization, protein modelling and expression during hypoxia. *Comp*
567 *Biochem Physiol, Part A Mol Integr Physiol* 269:111212.
568 <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2022.111212>

569 Hernández-Aguirre LE, Cota-Ruiz K, Peregrino-Uriarte AB, et al (2021) The gluconeogenic
570 glucose-6-phosphatase gene is expressed during oxygen-limited conditions in the white
571 shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: Molecular cloning, membrane protein modeling
572 and transcript modulation in gills and hepatopancreas. *J Bioenerg Biomembr* 3:449–461.
573 <https://doi.org/10.1007/s10863-021-09903-6>

574 Hutton JC, O'Brien RM (2009) Glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene family. *J Biol*
575 *Chem* 284:29241–29245. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.025544>

576 Jitrapakdee S (2012) Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal
577 regulation of hepatic gluconeogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 44:33–45.
578 <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.10.001>

579 Le SQ, Gascuel O (2008) An improved general amino acid replacement matrix. *Mol Biol*
580 *Evol* 25:1307–1320. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn067>

581 Lord-Dufour S, Copland IB, Levros L-C, et al (2009) Evidence for transcriptional regulation
582 of the glucose-6-phosphate transporter by HIF-1 α : Targeting G6PT with mumbaistatin
583 analogs in hypoxic mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* 27:489–497.
584 <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0855>

585 Martins TL, Chittó ALF, Rossetti CL, et al (2011) Effects of hypo- or hyperosmotic stress
586 on lipid synthesis and gluconeogenic activity in tissues of the crab *Neohelice granulata*.
587 *Comp Biochem Physiol, Part A Mol Integr Physiol* 158:400–405.
588 <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.11.023>

589 Pérez-Rostro CI, Racotta IS, Ibarra AM (2004) Decreased genetic variation in metabolic
590 variables of *Litopenaeus vannamei* shrimp after exposure to acute hypoxia. *J Exp Mar Biol*
591 *Ecol* 302:189–200. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2003.10.010>

592 Reyes-Ramos CA, Peregrino-Uriarte AB, Cota-Ruiz K, et al (2018) Phosphoenolpyruvate
593 carboxykinase cytosolic and mitochondrial isoforms are expressed and active during hypoxia
594 in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comp Biochem Physiol B, Biochem Mol Biol*
595 226:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2018.08.001>

596 Rosas C, Martinez E, Gaxiola G, et al (1999) The effect of dissolved oxygen and salinity on
597 oxygen consumption, ammonia excretion and osmotic pressure of *Penaeus setiferus*
598 (Linnaeus) juveniles. *J Exp Mar Biol Ecol* 234:41–57. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(98\)00139-7](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(98)00139-7)

600 Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C T
601 method. *Nature Protocols* 3:1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>

602 Scholnick DA, Barabas AE, Cowan SS (2006) The influence of chloride on glucose export
603 in marine crabs: sensitivity of glucose-6-phosphatase to chloride ion. *J Crustacean Biol*
604 26:510–514. <https://doi.org/10.1651/S-2669a.1>

605 Semenza GL (2007) Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci STKE* 2007:cm8.
606 <https://doi.org/10.1126/stke.4072007cm8>

607 Soñanez-Organis JG, Peregrino-Uriarte AB, Sotelo-Mundo RR, et al (2011) Hexokinase
608 from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: cDNA sequence, structural protein model and
609 regulation via HIF-1 in response to hypoxia. *Comp Biochem Physiol B, Biochem Mol Biol*
610 158:242–249. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.12.006>

611 Soñanez-Organis JG, Racotta IS, Yepiz-Plascencia G (2010) Silencing of the hypoxia
612 inducible factor 1 –HIF-1- obliterates the effects of hypoxia on glucose and lactate
613 concentrations in a tissue-specific manner in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. J Exp Mar
614 Biol Ecol 393:51–58. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.06.031>

615 Soñanez-Organis JG, Rodriguez-Armenta M, Leal-Rubio B, et al (2012) Alternative splicing
616 generates two lactate dehydrogenase subunits differentially expressed during hypoxia via
617 HIF-1 in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. Biochimie 94:1250–1260.
618 <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.02.015>

619 Spyropoulos IC, Liakopoulos TD, Bagos PG, Hamodrakas SJ (2004) TMRPres2D: high
620 quality visual representation of transmembrane protein models. Bioinformatics 20:3258–
621 3260. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth358>

622 Stukey J, Carman GM (1997) Identification of a novel phosphatase sequence motif. Protein
623 Sci 6:469–472

624 Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis
625 version 11. Mol Biol Evol 38:3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

626 Thabrew MI, Poat PC, Munday KA (1971) Carbohydrate metabolism in *Carcinus maenas*
627 gill tissue. Comp Biochem Physiol B, Biochem Mol Biol 40:531–541.
628 [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(71\)90238-0](https://doi.org/10.1016/0305-0491(71)90238-0)

629 Trasviña-Arenas CH, Garcia-Triana A, Peregrino-Uriarte AB, Yepiz-Plascencia G (2013)
630 White shrimp *Litopenaeus vannamei* catalase: gene structure, expression and activity under
631 hypoxia and reoxygenation. Comp Biochem Physiol B, Biochem Mol Biol 164:44–52.
632 <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2012.10.004>

633 Wallert MA, Foster JD, Scholnick DA, et al (2001) Kinetic analysis of glucose-6-
634 phosphatase: an investigative approach to carbohydrate metabolism and kinetics. Biochem
635 Mol Biol Educ 29:199–203. <https://doi.org/10.1111/j.1539-3429.2001.tb00121.x>

636 Wang Y, Wang H, Li M, et al (2015) Identification, expression and regulation of amphioxus
637 G6Pase gene with an emphasis on origin of liver. Gen Comp Endocrinol 214:9–16.
638 <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.12.021>

639 Yun Z, Maecker HL, Johnson RS, Giaccia AJ (2002) Inhibition of PPAR γ 2 gene expression
640 by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stral3: A mechanism for regulation of adipogenesis by
641 hypoxia. Dev. Cell 2:331–341. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00131-4](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00131-4)

642 Zhang X, Yuan J, Sun Y, et al (2019) Penaeid shrimp genome provides insights into benthic
643 adaptation and frequent molting. Nat Commun 10:356. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08197-4>

645 Zhang Y, Zhang Z, Liang XF, et al (2021) Response of g6p homologous genes in Chinese
646 perch to high-carbohydrate diets. Aquac Rep 19:100581.
647 <https://doi.org/10.1016/J.AQREP.2020.100581>

648 **Figure captions**

649 **Fig. 1.** Nucleotide and deduced protein sequence of G6Pase2. The cDNA nucleotide
650 sequence is shown in lowercase letters and the deduced protein is in capital letters. The
651 continuous line at the beginning indicates the 5'-UTR and the underline shows the primers
652 used. Catalytic amino acids are between * and the PAP2-G6Pase domain is indicated in
653 square brackets [] and in bold.

654 **Fig. 2** Multiple alignment of the amino acid sequences of from *P. vannamei* G6Pases and
655 selected species. The intensity of the gray color indicates higher conservation between the
656 sequences aligned, the catalytic amino acids are highlighted in red.

657 **Fig. 3** Transmembrane topology prediction of G6Pase1 (A) and G6Pase2 (B). Predicted with
658 the CCTOP server (Dobson et al., 2015) and visualized using the TMRPres2D (Spyropoulos
659 et al., 2004). Catalytic amino acids are indicated with a C.

660 **Fig. 4** Phylogenetic tree based on multiple alignment of 17 G6Pase amino acid sequences
661 from different species.

662 **Fig. 5** Relative expression of G6Pase1 and G6Pase2 (panel A) and G6Pase activity (panel B)
663 in hepatopancreas, gills and muscle in normoxia and after 2 h of feeding. Bars represent mean
664 $\pm$ SEM (n=3). (*) indicates expression not detected and lowercase letters indicate differences
665 between tissue ($p < 0.05$).

666 **Fig. 6** HIF-1 expression in different oxygenation conditions in hepatopancreas. N, normoxia;
667 H, hypoxia; H/R, hypoxia plus 1 h of reoxygenation. Bars represent mean $\pm$ SEM (n=5). (*)
668 indicates significant difference respect to the control (N 0 h). The literals indicate differences

669 between knock-down (injected with dsRNA in dark blue) and unsilenced animals (injected
670 with saline solution in light blue) ($p < 0.05$).

671 **Fig. 7** Effect of HIF-1 knock-down in the relative expression of G6Pase1 (A) and G6Pase2
672 (B) in hepatopancreas, and G6Pase1 in gills (C) of shrimp under different oxygenation
673 conditions. N, normoxia; H, hypoxia; H/R, hypoxia plus 1 h of reoxygenation. Bars
674 represents the mean $\pm$ SEM ($n=3-5$). (*) indicates significant differences compared to the
675 control group (N 0 h). The literals indicate differences between knock-down (injected with
676 dsRNA in dark blue) and unsilenced animals (injected with saline solution in light blue) ($p <$
677 0.05).

678 **Tables**

679 **Table 1.** Primers used to obtain the cDNA nucleotide sequences and for expression
680 quantification

Primer	Sequence (5'→ 3')
qG6PF2	GAAACTAGACCACTTCTGCGT
qG6PR2	TCCAAGCGAAATGCCCAACA
qG6P2F5	GAACGTGCTTTGGTCCCTCG
qG6P2R4	ACACCGGAGTAGCGAGAGAA
G6P2F3	ATGGAGGCCTACACCGAAATG
G6P2R3	TCATTCTTCTTGTACTTGTTCGCC
G6P2R6	ATGGAGAGCCACAACCACGGGGAAATACAA
G6P2R7	AGTACGGCCTGTCACCTGCTATGCACCAC
Gene Racer 5' Primer	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA
Gene Racer 5' Nested Primer	GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA
L8F2	TAGGCAATGTCATCCCCATT
L8R2	TCCTGAAGGGAGCTTTACACG
HIFFJ2	GCAATCAGCTTTCTGCTCCC
HIFRJ2	GGTCAGGGTCCATCAATAGC

681

682 **Table 2.** Protein sequences used for alignment and phylogenetic analysis

Scientific name	Isoform	GenBank accession number
<i>Homo sapiens</i>	G6Pase1	NP_000142.2
<i>Homo sapiens</i>	G6Pase2	Q9NQR9.1
<i>Mus musculus</i>	G6Pase1	NP_032087.2
<i>Mus musculus</i>	G6Pase2	NP_067306.1
<i>Rattus norvegicus</i>	G6Pase1	NP_037230.2
<i>Dermacentor andersoni</i>	G6Pase2	XP_050034452.1
<i>Rhipicephalus microplus</i>	G6Pase2	XP_037279117.1
<i>Tetranychus urticae</i>	G6Pase	XP_015793132.1
<i>Homarus americanus</i>	G6Pase1	XP_042217107.1
<i>Penaeus (Litopenaeus) vannamei</i>	G6Pase1	UJO02151.1
<i>Penaeus (Litopenaeus) vannamei</i>	G6Pase2	▲ OP377076
<i>Macrobrachium nipponense</i>	G6Pase	ALK82315.1
<i>Penaeus chinensis</i>	G6Pase1	XP_047474896.1
<i>Penaeus japonicus</i>	G6Pase1	XP_042855681.1
<i>Penaeus monodon</i>	G6Pase	XP_037777646.1
<i>Haloferax gibbonsii</i> ATCC 33959	G6Pase	ELZ83903.1
<i>Haloarcula hispanica</i> ATCC 33960	G6Pase	AEM55699.1

683

Table 3. Silencing efficiencies of HIF-1 α .

	3 h	24 h	48 h
N	66.36%	62.80%	65.25%
H	84.21%	53.81%	60.39%
HR	79.95%	73.96%	52.70%

N, normoxia; H, hypoxia; HR, hypoxia plus 1h reoxygenation
(n = 5, p <0.05)

684

685 **Figures**

686 **Fig. 1**

```

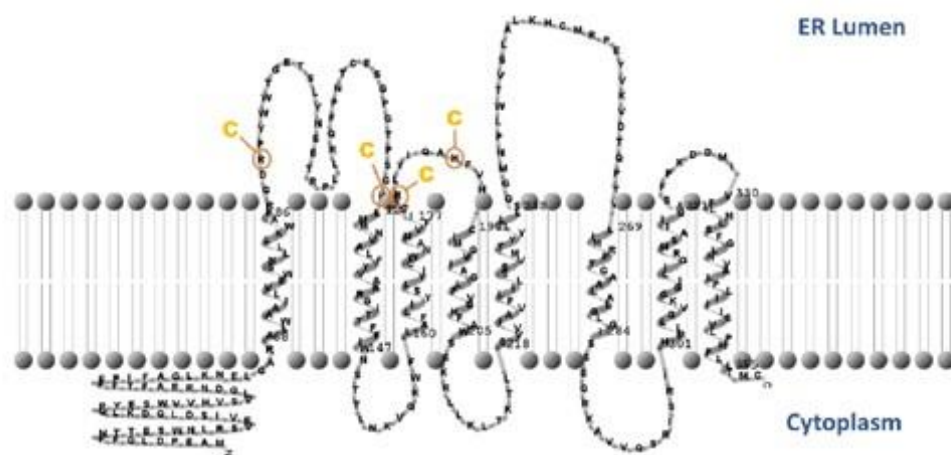
1      _____M E
1      gcatttgagaactcaggggagacaggacaacacgcgtacacaccgcagaccacagaccgcagaccacagaccacaatggaag
3      A Y T E M S H K W G A E F I E S L Q T S L P G R G R M
      G6P2F3
81      gcctacaccgaaatgtctcacaaatggggggcggagtttatcgagagtctgcagaccagcctcccaggaagagggagaat
30     F M Q I S D I G D P G L A F T L Y F P V V V A L H A G
      G6P2R6
161    gtttatgcaaatcttgacatcggcgaccccgggctggccttcaccttgtatttccccgtggttgtggtctctccatgcgg
57     V G V [R L M W S I I F C E W S N M I L K W C I A G D
      G6P2R7
241    gcgtgggctgaggtgatgtggtctattatcttctgcgagtggtcgaatatgatccttaagtggtgcatagcaggtgac
83     *R* P Y W W V H E T P V Y A H R R P P V L M Q Y P R T C
321    agggcgtactggtggtggcacgagacgcccggtgtacgccaccgcagggccgctgctcatgcagtaccgcgcacttg
110    E T G P G M P S G *H* A K L N A A M F Y I L V S A F N E
401    tgagacgggacccggcatgccctcggttcacgccaaactgaacggcgccatgttctatatcctggtttccgcgttcaacg
137    M V V K N T T L L S Q K Q R A W A S R G L W A S Y A
481    agatggtggtcaagaacacgacgcttctgagccagaagcagcgggctgggctgcgcgagggctgtgggctgctacgca
163    I W M M L V L V S *R* T Y I A A *H* F P H Q C V A G A L I
561    atatggtgatgttgggtgttgggtttcaaggacttacatcgccgccacttcccgcacagtgctgtggcggggcgtctcat
190    G L M M A M M V S R M] F V L Q H L S R R Q Y V A L S V
641    aggcttgatgatggctatgatggtgtctcgcatgcccgctettacagcacctctcccgcgctcagtacgtggcactctctg
217    T I I V S V L G I Y P S V R T I G G N V L W S L E K
      qG6P2F5
721    tcaccatcatcgctctcgtctccttggtgatctatttcagcgtgagaaccatcggcgggaacgtgcttggctcctcgaaaag
243    A I K W C V K R E Y I H I D S T P F Y S F S R Y S G V
      qG6P2R4
801    gccattaagtgggtgcgtgaagagggagtatatcacattgattctactccattctactccttctctcgtactccggtgt
270    S L G L G L G L S S S W F K K A A K S R F S T N M I V
881    ctgctcggtctcggaactcggtctctcctcgctcctgggttcaagaaagcggccaagtcgagattcagcaccaacatgatcg
297    S L A V L N F V T S Q I G V V V H K S L S P A M F G
961    tgtccctcgccgtcctcaacttcgtcacgagtcagattggcgtcgtcgtgcacaagtcctctcgccggccatgtttggg
323    W Y V A E F T L N C T V T F M L V A A L P N F V R V V
1041  tggatgtggcggaattcactctcaactgcaccgtgaccttcctgctggtggcgcccttccgaatttcgtcagggctgt
350    Y S A R A G D K G K K K *
      G6P2R3
1121  gtacagtgacgcgcgggacacaagggcacaagaaagtga

```

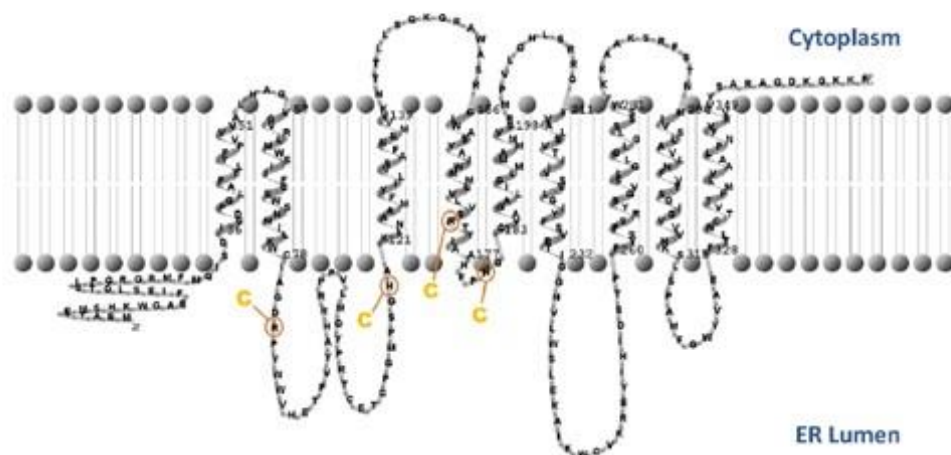
687

		10	20	30	40	50	60	70	80					
<i>P.japonicus.G6Pase1</i>	1	----	MESVIEET----	YHK--	WGAEF	ETLCT	SMPGRGRMF	QVSDIG	PGLAT	TLVYVVVA	HAGVVR	LMWSIT	FC	70
<i>P.chinensis.G6Pase1</i>	1	----	MENYIEM----	SHK--	WGAEI	ESLCT	SMPGRGRMF	QVSDIG	PGLAT	TLVYVVVA	HAGVVR	LMWSIT	FC	70
<i>M.nipponense.G6Pase</i>	1	----	MEKALAFVES----	YHK--	WGAEI	ESLCT	SMPGRGRMF	QVSDIG	PGLAT	TLVYVVVA	HAGVVR	LMWSIT	FC	73
<i>L.vannameli.G6Pase2</i>	1	----	MEAYTEM----	SHK--	WGAEF	ESLCT	SMPGRGRMF	QVSDIG	PGLAT	TLVYVVVA	HAGVVR	LMWSIT	FC	70
<i>L.vannameli.G6Pase1</i>	1	MAEPDLQFFNTT--	ESWNL--	RSVEV	ISDLO	DKLPQ	YESWVVHVS	VLG	NREAT	TF	FF	FA	CKNEL	77
<i>H.sapiens.G6Pase1</i>	1	----	MEEGMN----	VLMD--	FGIQSTHYLQ	VNYQDSQ	DWFLVSV	IA	LRNA	YVLF	WFW	QEA	IKLLWVAV	70
<i>H.americanus.G6Pase1</i>	1	----	MESLVDT----	YHQ--	WGAEI	ESLCT	SMPGRGRMF	QVSDIG	PGLAT	TLVYVVVA	HAGVVR	LMWSIT	FC	70
<i>D.magna.G6Pase3</i>	1	----	MASELQS----	IYS--	YGVLSIS	SSSFR	OGESF	EMDIK	IF	PKYV	IVY	EIFA	QWAI	70
		90	100	110	120	130	140	150	160					
<i>P.japonicus.G6Pase1</i>	71	SNMELK	WLCIAD	RYWVHET	PIY--	A-QRRP	VLMDYPR	CTG	QMP	SG	AKLN	AMFY	ILVSA	146
<i>P.chinensis.G6Pase1</i>	71	SNMELK	WLCIAD	RYWVHET	PVY--	A-HRRP	VLMDYPR	CTG	QMP	SG	AKLN	AMFY	ILVSA	148
<i>M.nipponense.G6Pase</i>	74	SNMELK	WLMYGD	RYWVNET	KLK--	S-KSRP	ILLQFPN	CTG	QMP	SG	AKLN	AMFY	ILVSA	151
<i>L.vannameli.G6Pase2</i>	71	SNMELK	WLCIAD	RYWVHET	PIY--	A-HRRP	VLMDYPR	CTG	QMP	SG	AKLN	AMFY	ILVSA	148
<i>L.vannameli.G6Pase1</i>	78	SNLLK	WAFRCD	RYWVTGET	SLY--	N-EETRL	LRQFPN	CES	QPT	SG	LMMNV	LEY	VVA	155
<i>H.sapiens.G6Pase1</i>	71	LNLYF	KWILFQ	RYWVLD	TDY--	S-NTSV	LKQFPN	CTG	QMP	SG	AKLN	AMFY	ILVSA	146
<i>H.americanus.G6Pase1</i>	71	SNMELK	WLMYGD	RYWVHET	KLK--	A-HRVP	YVHFPN	CTG	QMP	SG	AKLN	AMFY	ILVSA	148
<i>D.magna.G6Pase3</i>	71	LNQVL	KWLMHGD	RYWVHET	VEVAYS	TSLL	EIFYRS	CTG	QMP	SG	AKLN	AMFY	ILVSA	149
		170	180	190	200	210	220	230	240					
<i>P.japonicus.G6Pase1</i>	149	QRVWAS	RGLAA	YGIWMML	LIS	TYIAA	FPHQ	YAGAL	IGLLM	MMVSR	MPV	LQHL	TRRQ	228
<i>P.chinensis.G6Pase1</i>	149	QRVWAS	RGLAA	YGIWMML	LIS	TYIAA	FPHQ	YAGAL	IGLLM	MMVSR	MPV	LQHL	TRRQ	228
<i>M.nipponense.G6Pase</i>	152	QKFLAK	RTHLAY	GTWMA	LIA	AVVAA	FPHQ	YAGAL	IGLLM	MMVSR	MPV	LQHL	TRRQ	231
<i>L.vannameli.G6Pase2</i>	149	QRAWAS	RGLAA	YGIWMML	LVS	TYIAA	FPHQ	YAGAL	IGLLM	MMVSR	MPV	LQHL	TRRQ	228
<i>L.vannameli.G6Pase1</i>	156	QKWF	LAF	LIYSL	ICWNAM	FIS	LYQA	AVVQ	IMQV	IA	ELFV	GHF	AWSS	235
<i>H.sapiens.G6Pase1</i>	147	RFRCLN	VIL	LGFWAY	QLN	CLS	IILAA	FPHQ	YAGAL	IGLLM	MMVSR	MPV	LQHL	226
<i>H.americanus.G6Pase1</i>	149	QQRWAC	RGLAA	YGIWMML	LVS	TYIAA	FPHQ	YAGAL	IGLLM	MMVSR	MPV	LQHL	TRRQ	228
<i>D.magna.G6Pase3</i>	150	LKQSQ	IQLL	AA	FVVIQTL	VMS	MTAA	FPHQ	YAGAL	IGLLM	MMVSR	MPV	LQHL	229
		250	260	270	280	290	300	310	320					
<i>P.japonicus.G6Pase1</i>	229	VRTIG	GNVLS	LEK	IKWV	KREI	IHIDST	FYS	SRYS	VSLGL	GLG	SSW	FKAA	308
<i>P.chinensis.G6Pase1</i>	229	VRTIG	GNVLS	LEK	IKWV	KREI	IHIDST	FYS	SRYS	VSLGL	GLG	SSW	FKAA	308
<i>M.nipponense.G6Pase</i>	232	VLAM	GNVLS	LEK	IKWV	QVRS	IHIDST	FYS	SRYS	VSLGL	GLG	SSW	FKAA	311
<i>L.vannameli.G6Pase2</i>	229	VRTIG	GNVLS	LEK	IKWV	KREI	IHIDST	FYS	SRYS	VSLGL	GLG	SSW	FKAA	308
<i>L.vannameli.G6Pase1</i>	236	LLSQ	GNVLS	LEK	IKWV	KREI	IHIDST	FYS	SRYS	VSLGL	GLG	SSW	FKAA	315
<i>H.sapiens.G6Pase1</i>	227	LKGL	VDLL	TEK	QKRW	QEP	EWV	HI	DTT	FAS	LLN	LT	PL	306
<i>H.americanus.G6Pase1</i>	229	YKAM	GNVLS	LEK	IKWV	KREI	IHIDST	FYS	SRYS	VSLGL	GLG	SSW	FKAA	308
<i>D.magna.G6Pase3</i>	230	LLT	RNP	ASIS	QYK	WAKREI	IHIDST	FYS	SRYS	VSLGL	GLG	SSW	FKAA	309
		330	340	350	360	370								
<i>P.japonicus.G6Pase1</i>	309	GVFV	HKSL	-SPAMF	GWYV	AE	TLNCT	VTF	MLV	AA	LN	FRV	VAYN	361
<i>P.chinensis.G6Pase1</i>	309	GVIV	HRSL	-SPAMF	GWYV	AE	TLNCT	VTF	MLV	AA	LN	FRV	VAYN	361
<i>M.nipponense.G6Pase</i>	312	GVYI	HKLL	-SPAMF	GWYV	VE	TLNV	VVF	TL	VAVI	LN	FRV	VAYN	364
<i>L.vannameli.G6Pase2</i>	309	GVVY	HKSL	-SPAMF	GWYV	AE	TLNCT	VTF	MLV	AA	LN	FRV	VAYN	361
<i>L.vannameli.G6Pase1</i>	316	SAII	QAS	FPK	DDMI	IVFL	MLSL	GLN	V	ALPL	II	SVL	HELL	358
<i>H.sapiens.G6Pase1</i>	307	HVFD	SLK	PPS	QV	ELV	FVLS	CK	SA	VV	PLAS	SVI	YCLA	357
<i>H.americanus.G6Pase1</i>	309	GVF	AHSL	-KPT	MTG	WYLA	TLN	V	VTE	VL	AGL	NL	RVAS	361
<i>D.magna.G6Pase3</i>	310	AEL	AHVA	IPK	TNES	VFT	LE	LLN	V	FPY	IA	ILV	YV	359

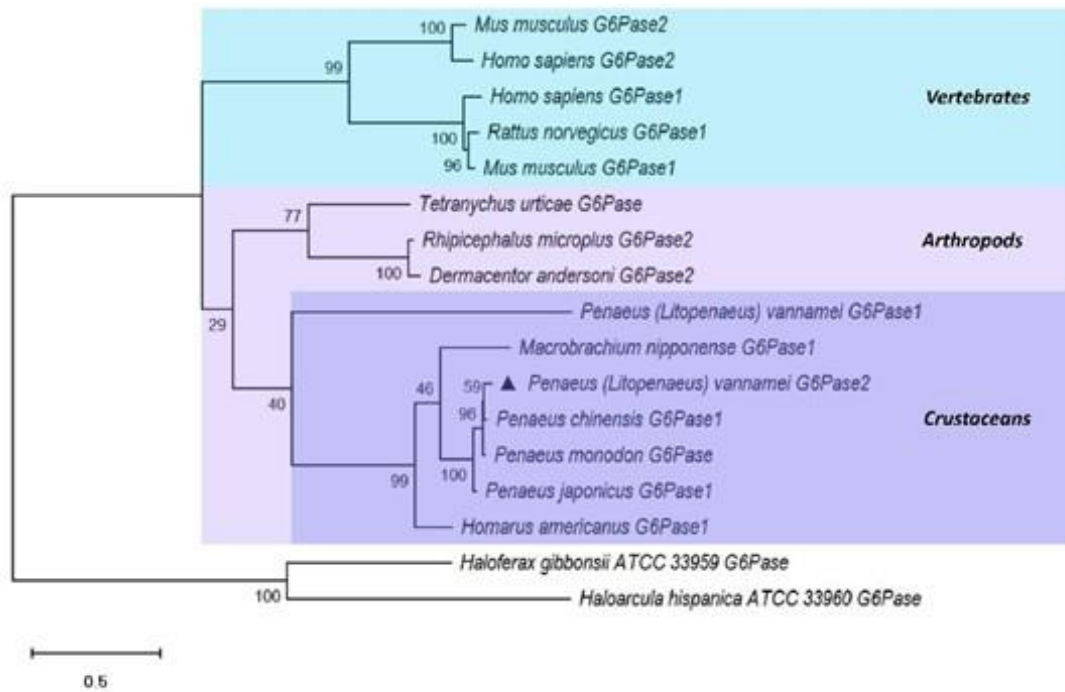
A



B

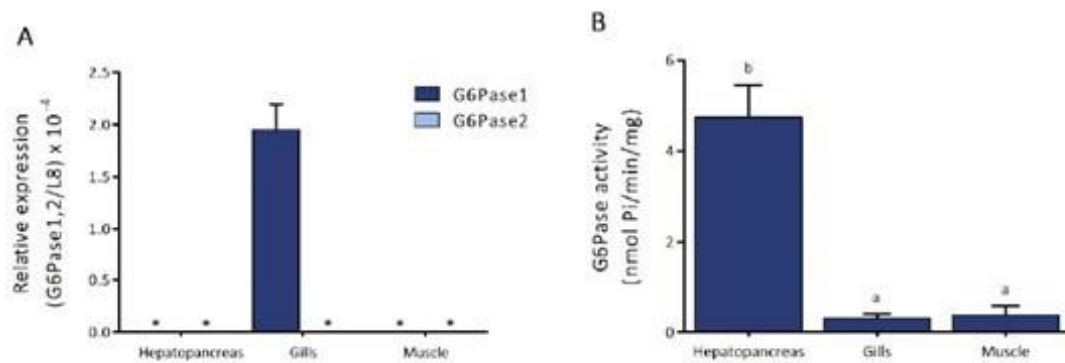


692 **Fig. 4**



693

694 **Fig. 5**

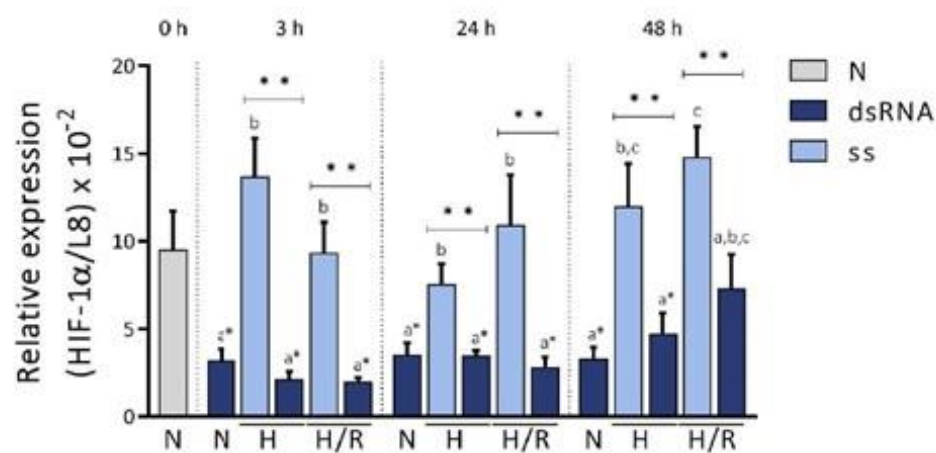


695

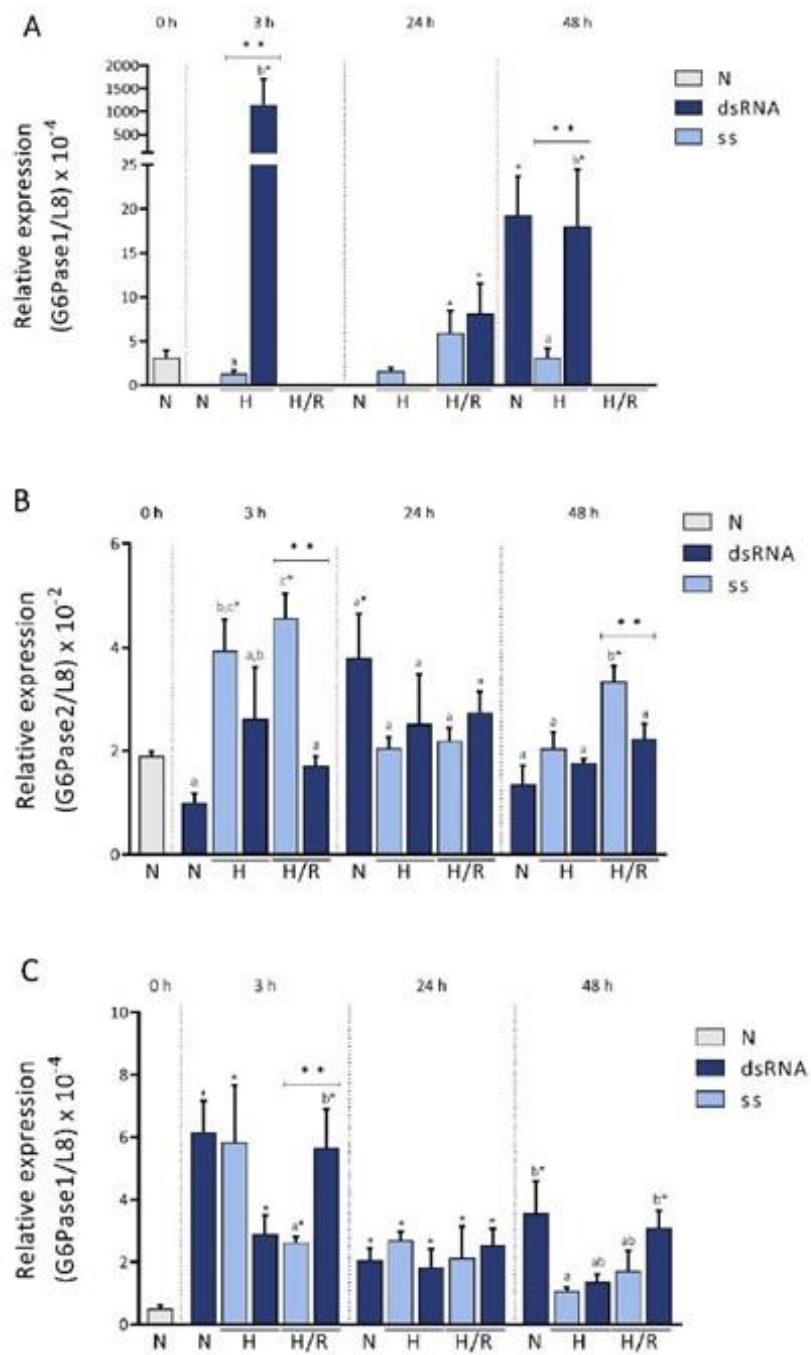
696

697

698 **Fig. 6**



699



4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

El estudio individual y enfocado de las enzimas que participan en el metabolismo de los carbohidratos y en específico, de las enzimas que realizan las reacciones irreversibles, es una estrategia que se usa para poder inferir el estado energético en el que se encuentran los organismos y que nos ayuda a reconocer las respuestas fisiológicas que se desencadenan frente a una situación dada. En esta tesis se analizaron las isoformas de la enzima gluconeogénica y glucogenolítica G6Pasa del camarón blanco. En vertebrados se han identificado principalmente tres isoenzimas de la G6Pasa denominadas como G6Pasa-I, G6Pasa-II y G6PasaIII (Hutton y O'Brien, 2009), sin embargo, la información sobre caracterización, expresión, y la regulación de los genes de la G6Pasa es bastante limitada en invertebrados. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio molecular y bioquímico de la G6Pasa en crustáceos, enzima clave en el metabolismo de los carbohidratos.

4.1. G6Pasa1 del Camarón Blanco del Pacífico

La G6Pasa (que posteriormente se nombró como G6Pasa1) fue inicialmente identificada por un análisis del transcriptoma y genoma del camarón (Ghaffari *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2019). Posteriormente, tanto el gen como el transcrito derivado, se obtuvieron de forma experimental mediante el diseño de oligonucleótidos específicos, amplificación por diferentes técnicas de PCR, clonación de los fragmentos amplificados y secuenciación de las cadenas sentido y antisentido, seguido de un análisis bioinformático profundo. El gen *G6Pasa1* del camarón es 99.07% idéntico al depositado en el genoma (Zhang *et al.*, 2019), mientras que la secuencia codificante (CDS) es 99.8% idéntica al transcrito previamente publicado (Ghaffari *et al.*, 2014). Aunque son pocas, las diferencias encontradas pueden ser atribuidas a las distintas poblaciones a las que pertenecen los especímenes estudiados, sin embargo, la G6Pasa obtenida experimentalmente y analizada de manera específica en este trabajo ya se encuentra disponible en el banco de genes del NCBI con el número de acceso MW246958. El gen tiene una longitud de 2823 pb desde la metionina inicial hasta el codón de paro, y consta de siete exones de 86, 165, 207, 131, 252, 119 y 117 pb cada uno,

interrumpidos por seis intrones con cinco codones divididos. Todos los intrones contienen las secuencias consenso 5'-GT-AG-3' necesarias para el correcto splicing del RNA (Breathnach *et al.*, 1978) y el número y tamaño de exones e intrones corresponde con lo reportado en otras especies (Wang *et al.*, 2015).

La composición promedio de bases A/T y G/C es de 56.43% y 43.57% para los exones y de 73% y 27% para los intrones respectivamente. La estructura exón-intrón del gen *G6Pasa1* del camarón tiene mayor similitud a la de los artrópodos, como es el caso de las polillas *Ostrinia furnacalis* (Gene ID: 114364740) y *Bombyx mori* (Gene ID: 101742080) con siete exones interrumpidos por seis intrones, mientras que la mayoría de los genes en los mamíferos están compuestos por cinco o seis exones codificantes. El gen del camarón comparte el mismo tamaño y posición del segundo y cuarto exón codificante de los artrópodos mencionados anteriormente, probablemente debido a su proximidad filogenética, aunque la longitud de los intrones y los genes completos son diferentes. Por otro lado, la CDS se obtuvo a partir de cDNA sintetizado de branquias. Esta tiene una longitud de 1077 pb que codifica para 358 residuos de aminoácidos desde la metionina inicial (ATG) hasta el codón de paro (TAA) en la posición 1075, y la proteína deducida tiene los valores calculados para el punto isoeléctrico y el peso molecular de 9.25 y 40.74 kDa, respectivamente. El análisis con Pfam 32.0 mostró que la G6Pasa de camarón tiene el dominio PAP2-glucosa-6-fosfatasa característico de todas las isoformas de G6Pasas, sin péptido señal, lo que es típico de las G6Pasas conocidas (Stukey y Carman, 1997). Los aminoácidos catalíticos RHRH se identificaron mediante alineamientos de secuencias de proteínas homólogas, siendo estos totalmente conservados.

Aunque el porcentaje de identidad entre las G6Pasas contrastadas fue relativamente bajo (< 36%), la funcionalidad clave para la homeostasis de glucosa, se ha comprobado para otras especies pese a esta característica, lo que podría indicar que la G6Pasa del camarón también es una enzima activa (Ghosh *et al.*, 2002; Metón *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2015). Del mismo modo, para entender la relación entre secuencias homólogas de G6Pasas por sí mismas, se construyó un árbol filogenético con 25 secuencias de proteínas obtenidas de la base de datos del NCBI. Con ello se identificaron dos grupos diferenciados entre vertebrados e invertebrados, ubicando a la G6Pasa del camarón en este último como se había hipotetizado, destacando su relación más cercana al langostino de agua dulce *Macrobrachium nipponense*, la única otra secuencia conocida de esta proteína en crustáceos hasta el momento del estudio. Interesantemente, las isoenzimas de la G6Pasa en vertebrados se agruparon claramente en clados separados, mientras que en invertebrados no parece existir una

diferencia notable, lo que indica su mayor proximidad en este grupo.

El análisis reciente de la estructura topológica de la G6Pasa1 del camarón con la herramienta bioinformática CCTOP (Dobson *et al.*, 2015) predice 8 hélices transmembranales (TM). La predicción también indica que cuatro asas están orientadas hacia el lumen del retículo endoplásmico (RE), mientras que tres asas junto con los extremos N y C terminales de la proteína están orientados hacia el citoplasma. Dado que a la fecha no existe una estructura tridimensional de la G6Pasa resuelta experimentalmente, el modelo obtenido *in silico* está sustentado con más de 75% de confiabilidad con respecto a la G6Pasa1 humana (número de acceso TOPDB: AP021110).

4.2. G6Pasa2 del Camarón Blanco del Pacífico

La G6Pasa2 del camarón se identificó y caracterizó con la misma estrategia experimental usada para la G6Pasa1. Aunque se amplificaron, clonaron y secuenciaron algunos fragmentos, la secuencia completa del gen no se pudo obtener experimentalmente debido a su complejidad y tamaño (**Fig. 4**). El análisis *in silico* del genoma del camarón con respecto a esta isoforma (Zhang *et al.*, 2019) mostró que el gen podría estar interrumpido por intrones de más de 9,000 pb de longitud con regiones ricas en microsatélites, siendo además fragmentos con distintas orientaciones y ubicaciones dentro del genoma (datos no publicados). Por un lado, esto indica una mayor complejidad entre los genes de ambas isoformas, y por otro, que las secuencias del genoma, debido a su constante actualización, aún no están por completo anotadas y no se pueden hacer inferencias certeras con la información hasta ahora disponible.

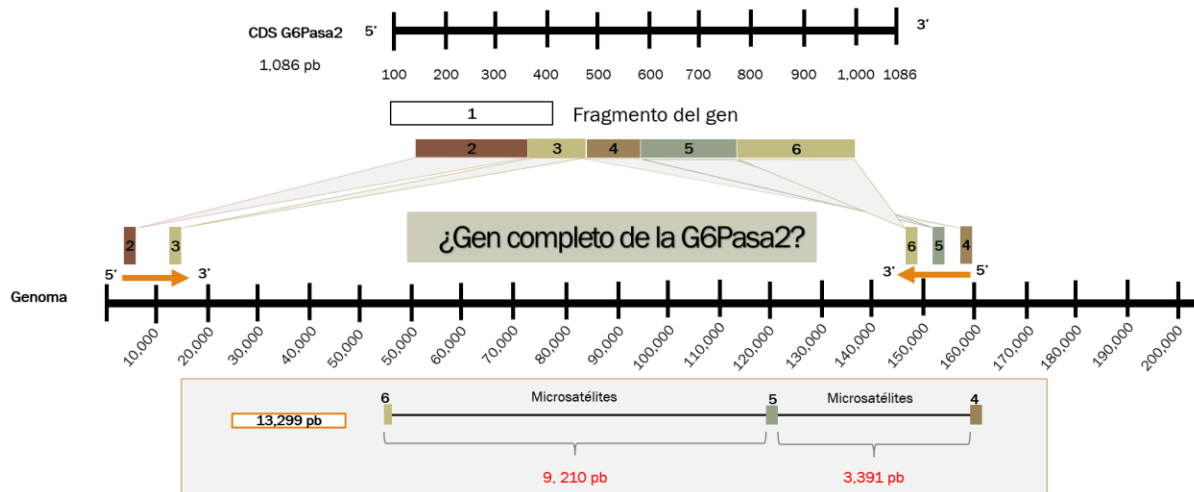


Figura 4. Esquematización de la complejidad estructural del gen de la G6Pasa2 del camarón blanco *L. vannamei* según los datos obtenidos del genoma (Zhang *et al.*, 2019).

De la misma manera, se obtuvo una región meramente putativa del promotor de la G6Pasa2 de 442 pb corriente arriba de la metionina inicial usando la herramienta metodológica Genome Walker (**Fig. 5**). Algunos de los sitios de regulación *cis* identificados *in silico* que se destacan son los *Sp1*, *TBP*, *C/EBPα* característicos de las regiones reguladoras de las G6Pasas en humanos (Hutton y O'Brien, 2009) y un sitio *HRE* de unión al factor de transcripción HIF-1 regulador en condiciones de hipoxia. Por la complejidad del gen que se menciona anteriormente, esta región promotora no pudo comprobarse experimentalmente, por lo que son datos no publicados, sin embargo, es una pauta para futuras investigaciones dirigidas a identificar más aspectos moleculares de la regulación de esta isoenzima en el camarón.

Región promotora putativa de G6Pasa2

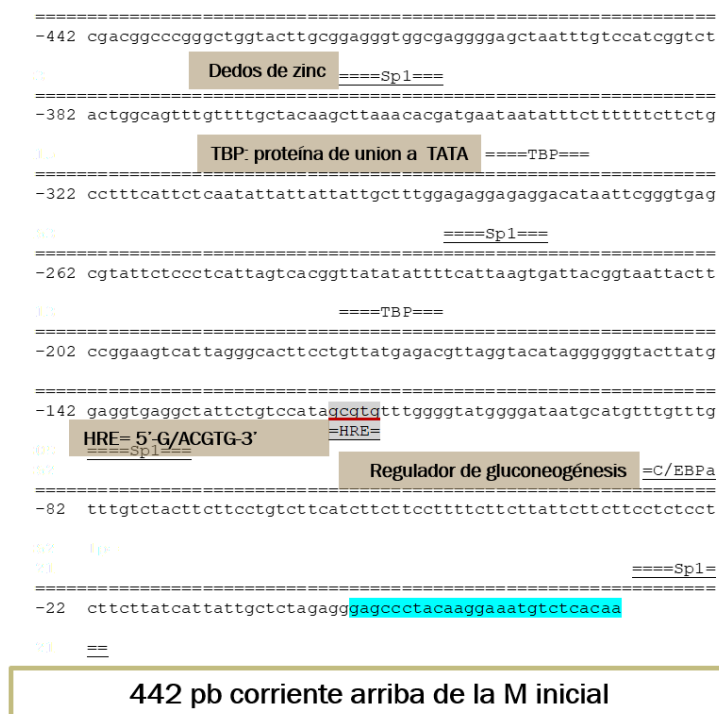


Figura 5. Secuencia putativa del promotor de la G6Pasa2.

Por otro lado, el transcrito de la G6Pasa2 se pudo obtener a partir de cDNA de hepatopáncreas, y la secuencia completa se encuentra en el banco de genes del NCBI con el número de acceso OP377076. El mRNA es de 1160 pb con una UTR 5' de 74 pb y su región codificante de 1086 pb que se traduce para una proteína de 361 residuos de aminoácidos. El punto isoeléctrico y peso molecular calculados son 9.84 y 40.58 kDa respectivamente. Tanto la CDS como la proteína deducida son similares en tamaño a la G6Pasa1 del camarón descrita en la sección anterior, y a los reportados en otros organismos de diferentes filos, siendo los aminoácidos catalíticos totalmente conservados incluyendo además, el dominio PAP2 característico (Ghosh *et al.*, 2002; Stuke y Carman, 1997).

Al comparar la estructura primaria de las proteínas de ambas isoformas del camarón encontramos que solamente comparten 34.13% de identidad, siendo incluso la G6Pasa2 más similar a otras proteínas homólogas de crustáceos como es el caso del camarón *Penaeus chinensis* (compartiendo más del 95% de identidad). Este resultado no sorprende ya que la baja identidad entre las isoformas

de la G6Pasa en la misma especie es una característica muy común. Por ejemplo, las G6Pasas humanas comparten 50.8% de identidad entre la I y la II, y un 35.6% entre la I y la III, lo que también ocurre en las isoformas de otros vertebrados; no obstante, las proteínas conservan su función de desfosforilación de G6P (Wang *et al.*, 2015), lo que probablemente indica que la G6Pasa2 del camarón, al igual que la G6Pasa1, son de hecho proteínas funcionales.

El modelo 2D de esa isoenzima se construyó tomando como referencia la G6Pasa2 de humanos con una confiabilidad de 76% (número de acceso TOPDB: AP02336), el cual muestra la presencia de 9 hélices TM, 4 vueltas y el N terminal orientados hacia el lumen del RE y 4 vueltas loops con el C terminal orientados hacia el citoplasma. La diferencia entre ambas isoformas del camarón en este análisis se ve principalmente en la cantidad de hélices y la orientación de los extremos de la proteína. Estas diferencias probablemente confieren a cada isoforma diferentes mecanismos reguladores que proporcionan mayor plasticidad metabólica a los camarones en diferentes condiciones ambientales, como se describirá más adelante. Sin embargo, y tomando en cuenta el bajo porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos de las dos proteínas, la estructura transmembranal es similar y en ambos casos los aminoácidos catalíticos están orientados hacia el lumen del RE lo que coincide con lo reportado ampliamente en vertebrados y concordando además, con su regulación por compartimentalización en la célula (Nordlie y Foster, 2010).

El análisis filogenético construido con secuencias de proteínas homologas, muestra la agrupación de las G6Pasas del camarón en el clado de los crustáceos, donde el bajo valor de bootstrap evidencia que entre isoenzimas hay menos diferencias en comparación con los vertebrados.

4.3. Actividad y Expresión de la G6Pasa en Normoxia

La expresión de las isoformas de la G6Pasa en camarones con 2 h de ayuno en normoxia, fue indetectable en hepatopáncreas, branquias y músculo, excepto para la G6Pasa1 en branquias. Estos resultados contrastan con la abundancia de la G6Pasa1 detectada en los tres órganos y de la G6Pasa2 en hepatopáncreas luego de que transcurrieron 24 h de ayuno (**Fig. 6**), lo que indica, como se ha descrito para otros organismos vertebrados e invertebrados, que la alimentación afecta la expresión de ambas isoformas respondiendo a eventos de estrés por diferentes tiempos de ayuno a través de

la participación de diversos factores/co-reguladores (Jitrapakdee, 2012; Martins *et al.*, 2011; Metón *et al.*, 2004; Scholnick *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2015; Werve *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2021). Frente al mismo estrés por ayuno en normoxia, la expresión de las enzimas gluconeogénicas FBP y PEPCCK en hepatopáncreas es menor que la detectada en branquias y músculo (Cota-Ruiz *et al.*, 2015; Reyes-Ramos *et al.*, 2018) lo que podría indicar la activación de la glucogenólisis en lugar de la gluconeogénesis como resultado del ayuno prolongado en este órgano, tomando en cuenta que se recurre a la movilización de carbohidratos (glucógeno) para la generación rápida de ATP (Sánchez-Paz *et al.*, 2007; Ulaje *et al.*, 2019).

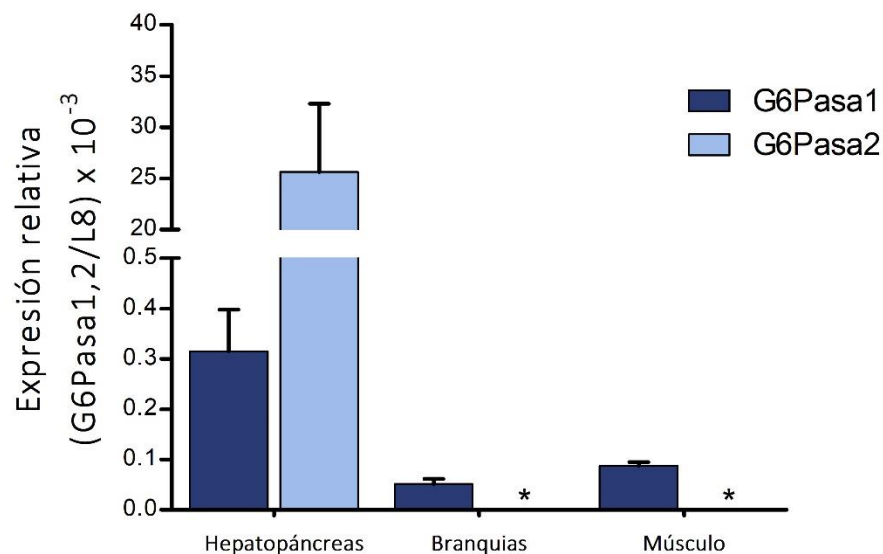


Figura 6. Expresión relativa de la G6Pasa1 y G6Pasa2 en hepatopáncreas, branquias y músculo de camarones con 24 h de ayuno en normoxia. Las barras representan la media $\pm$ el error estándar de la media (n=3-5). (*) indica que no se detectó expresión.

Por otro lado, la actividad G6Pasa en los camarones con 2 horas de ayuno si fue detectada en los tres tejidos, siendo más abundante en hepatopáncreas seguido de músculo y branquias. En condiciones óptimas de desarrollo del camarón, poco se ha estudiado sobre G6Pasa en invertebrados. Sin embargo, en vertebrados como el pez caimán moteado, el pez cebra, el pez arroz japonés y la trucha arcoíris, el hígado es el principal órgano con la mayor expresión de G6Pasa en comparación con las branquias, los músculos y los riñones, lo que demuestra que tiene un patrón

de expresión órgano-específico similar (Marandel *et al.*, 2017). Por lo tanto, podemos inferir que el hepatopáncreas es el órgano responsable del control glucémico en normoxia, coincidiendo con reportes previos (Cervellione *et al.*, 2017), siendo la G6Pasa un posible buen indicador del estado metabólico y fisiológico de los camarones.

La falta de correlación entre la expresión y la actividad de la enzima probablemente indica que en condiciones de normoxia la enzima se sintetiza y está presente en un nivel basal incluso cuando su expresión a nivel transcripcional es reprimida o disminuida debido a que no hay una situación celular que demande la síntesis de glucosa *de novo* para satisfacer una necesidad de ATP, similar a la falta de correlación que sucede en la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* en una dieta con glucosa (Panserat *et al.*, 2001).

Por el contrario, ya que la G6Pasa1 si es inducida en branquias pese al poco ayuno, esta podría estar implicada en las funciones de alta demanda energética como la respiración y la osmorregulación iónica en normoxia, a través de la gluconeogénesis o la glucogenólisis como se ha visto en *Carcinus maenas* y *Neohelice granulata* (Chausson y Regnault, 1995; Martins *et al.*, 2011; Thabrew *et al.*, 1971).

4.4. Regulación de la G6Pasa1 y G6Pasa2 vía HIF-1 en Hepatopáncreas y Branquias bajo Diferentes Condiciones de Oxigenación

Como se mencionó anteriormente, HIF-1 participa en la regulación transcripcional de diferentes enzimas del metabolismo de los carbohidratos en el camarón, en respuesta a la baja concentración de oxígeno y diferentes tiempos de exposición. Las isoformas de la G6Pasa no son la excepción, mostrando patrones de expresión condición/tiempo y órgano específicos cuando HIF-1 es silenciado mediante RNAi, una herramienta ampliamente usada para determinar este tipo de correlación.

En este trabajo se evaluó el efecto del silenciamiento de HIF-1 a las 3, 24 y 48 h de exposición a hipoxia e hipoxia seguida de un periodo de reoxigenación de 1 h (reoxigenación), en hepatopáncreas y branquias de camarones juveniles, mediante RT-qPCR. En hepatopáncreas, la G6Pasa1 se induce por efecto del silenciamiento de HIF-1 luego de 3 y 48 h de hipoxia, sin

embargo, su expresión es indetectable a las 3 y 48 h de reoxigenación, así como a las 3 y 24 h de normoxia. La inducción de la expresión de esta isoforma, por efecto del silenciamiento, se detectó únicamente en normoxia a las 48 h, mientras que a las 24 h la expresión sólo se detectó en el control sin silenciar en hipoxia y en reoxigenación, sin efecto significativo en este último.

La disminución del mensaje de HIF-1 en la célula por medio de RNAi, generalmente tiene un efecto contrario al que sucede con la G6Pasa1 en hepatopáncreas, ya que al ser este un activador de la transcripción, se espera que el silenciamiento inhiba su expresión, no obstante, realmente se induce. Otros estudios han obtenido resultados similares en el camarón, donde el silenciamiento de HIF-1 induce la expresión de la enzima GAPDH y aumenta la abundancia de metabolitos como glucosa y lactato en normoxia. Esto sugiere, que independientemente del estresor al que el organismo se encuentre expuesto, HIF-1 podría participar en la regulación del metabolismo de carbohidratos, posiblemente por la activación de rutas alternas estimuladas por la disminución de su mensaje en la célula (Camacho-Jiménez *et al.*, 2019; Soñanez-Organis *et al.*, 2010).

La regulación negativa *vía* HIF-1 ya se ha reportado en mamíferos. En fibroblastos embrionarios de ratón, el represor transcripcional DEC1/Stra13 actúa como un efector de HIF-1 en hipoxia, el que a su vez reprime al receptor nuclear PPAR γ 2 involucrado en la diferenciación celular, provocando la inhibición de la adipogénesis (Yun *et al.*, 2002). Aunque se desconoce un mecanismo similar de regulación negativa desencadenada por HIF-1 en el camarón, es probable que éste también actúe como represor en condiciones específicas, lo que da pie a futuras investigaciones.

En branquias del camarón blanco, la G6Pasa1 podría tener una regulación negativa mediada por HIF-1 similar a la descrita anteriormente. Lo anterior debido a que, aunque la hipoxia y reoxigenación inducen su expresión con respecto al control en normoxia (sin efecto significativo pero con una marcada tendencia), el silenciamiento de HIF-1 sólo la afecta durante la reoxigenación corta y prolongada (3 y 48 h) aumentando su expresión, con un patrón similar al descrito previamente en hepatopáncreas. Estos datos sugieren que la G6Pasa1 se regula tanto en hepatopáncreas como en branquias *vía* HIF-1.

El mismo análisis realizado sobre la G6Pasa2 mostró que ésta es específica de hepatopáncreas, ya que no fue detectada en branquias o músculo en ninguna de las condiciones evaluadas. En camarones no silenciados la expresión de la G6Pasa2 aumenta, en comparación con el control inicial en normoxia, luego de 3 h de hipoxia, y 3 y 48 h reoxigenación, así como en camarones

silenciados a las 24 h en normoxia. Sin embargo, la disminución del transcrito de HIF-1 inhibe la expresión de la G6Pasa2 a las 3 y 48 h de reoxigenación con una respuesta contraria a la observada en la G6Pasa1, denotando el papel inductor de HIF-1. Estos resultados concuerdan con lo reportado para GAPDH, la cual se regula de manera similar en hipoxia y reoxigenación a las 3 h *vía* HIF-1 (Camacho-Jiménez *et al.*, 2019).

Debido a que ambas isoformas de la G6Pasa en el camarón responden al estrés principalmente en las primeras horas, podría haber una inducción temprana por efecto de la hipoxia que se mantiene o exacerba durante la reoxigenación, destacando que los patrones de expresión son diferentes entre los órganos evaluados. Esto también ocurre en otros organismos, por ejemplo, en la perca china (*Siniperca chuatsi*), donde las isoformas *g6pca* y *g6pcb1* se expresan principalmente en hígado, en comparación con la isoforma *g6pc3*, que es más abundante en branquias (Zhang *et al.*, 2021), lo que indica que las G6Pasas se expresan de manera tejida específica.

Un resumen de estos resultados se presenta de forma esquemática en la figura 7 (**Fig. 7**), donde se puede identificar que la G6Pasa1 es inhibida por HIF-1 a las 3 h de hipoxia y al mismo tiempo la G6Pasa2 es inducida sin influencia de este factor de transcripción en el mismo tratamiento, sugiriendo que la G6Pasa2 responde a la falta de oxígeno en tiempos cortos en hepatopáncreas.

Interesantemente, cuando el oxígeno es restituido luego de este efecto, HIF-1 estimula la expresión de la G6Pasa2. Esto indica que en la presencia de oxígeno, este factor de transcripción podría estar activo, y que además, estimula la producción de glucosa posiblemente para contribuir a la homeostasis celular luego de dicho evento estresante, y para otros procesos que suceden de forma sinérgica durante la reoxigenación en hepatopáncreas (Estrada-Cárdenas *et al.*, 2021).

Un patrón similar se detecta en hipoxia y reoxigenación a largo plazo (48 h) en el mismo tejido, por lo que podría suceder un mecanismo similar donde la G6Pasa1 es inhibida por HIF-1 en hipoxia y la G6Pasa2 es estimulada en reoxigenación.

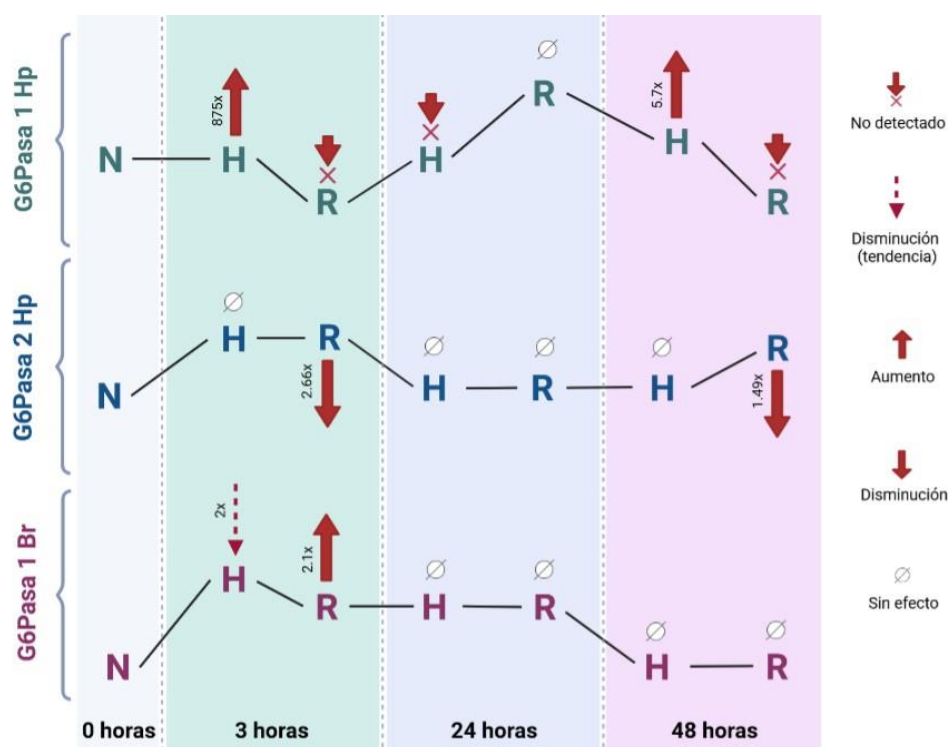


Figura 7. Representación de las respuestas de expresión de las isoformas de la G6Pasa en el camarón frente al estrés por hipoxia hipoxia-reoxigenación en diferentes tiempos, mediadas por HIF-1.

Por otro lado, en branquias la hipoxia estimula la expresión de la G6Pasa1 a las 3 h, posiblemente regulada por HIF-1, pero cuando el oxígeno es restituido luego de dicho estrés, HIF-1 inhibe esta isoforma.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, la G6Pasa1 en branquias podría contribuir a la generación de glucosa *de novo* como estrategia de supervivencia para suministrar energía y aumentar la tasa de ventilación, mientras que la G6Pasa2 en hepatopáncreas podría actuar en la homeostasis de glucosa con su distribución hacia otros órganos a través de la hemolinfa, lo que es necesario para estos organismos oxirreguladores (Lord-Dufour *et al.*, 2009). Lo que podría estar dado *vía* glucogenólisis ya que se sabe que las enzimas gluconeogénicas se expresan principalmente en tiempos prolongados de exposición al estrés en camarones (Cota-Ruiz *et al.*, 2015; Reyes-Ramos *et al.*, 2018).

5. CONCLUSIONES

En el camarón existen al menos dos isoformas de la G6Pasa cuya caracterización a nivel molecular realizada en este trabajo indica que ambas son enzimas activas. La actividad de la G6Pasa medida en tres diferentes tejidos del camarón sustenta esta información, comprobando además que la síntesis de glucosa está ocurriendo incluso cuando no hay un estresor aparente en los organismos. Del mismo modo, se comprueba que diferentes condiciones de oxigenación (normoxia, hipoxia y reoxigenación), tiempos de exposición y estado de ayuno influyen en la expresión de las dos isoformas, que son tejido específicas y su regulación parece estar fuertemente mediada por el factor de transcripción HIF-1. Por lo anterior, ambas isoenzimas podrían jugar un papel importante en la respuesta adaptativa del camarón a diversos factores ambientales.

6. RECOMENDACIONES

Los resultados de este trabajo indican que las G6Pasas del camarón participan en la respuesta a estrés por diferentes tiempos de hipoxia y reoxigenación a través de HIF-1 en branquias y hepatopáncreas, como sucede con otras enzimas del metabolismo en este organismo. Sin embargo, el análisis en conjunto de las enzimas reguladoras de la gluconeogénesis y glucogenólisis, así como el estudio del metaboloma en un mismo diseño experimental, podría proporcionar la información necesaria para obtener el panorama general del mecanismo de homeostasis de glucosa frente a una condición determinada, lo que permitiría conocer mejor las estrategias fisiológicas que el camarón utiliza para sobrevivir.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Arion, W.J., Lange, A.J., Walls, H.E., Ballas, L.M., 1980. Evidence for the participation of independent translocation for phosphate and glucose 6-phosphate in the microsomal glucose-6-phosphatase system. Interactions of the system with orthophosphate, inorganic pyrophosphate, and carbamyl phosphate. *J. Biol. Chem.* 255, 10396–10406. <https://doi.org/10.1007/BF01732001>
- Arzola G, J., Piña V, P., Nieves S, M., Medina J, M., 2013. Survival of white shrimp *Litopenaeus vannamei* poslarvae at different salinities and temperatures. *Rev. MVZ Córdoba* 18, 3618–3625.
- Breathnach, R., Benoist, C., O'Hare, K., Gannon, F., Chambon, P., 1978. Ovalbumin gene: evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 4853–4857.
- Breitburg, D., Levin, L.A., Oschlies, A., Grégoire, M., Chavez, F.P., Conley, D.J., Garçon, V., Gilbert, D., Gutiérrez, D., Isensee, K., Jacinto, G.S., Limburg, K.E., Montes, I., Naqvi, S.W.A., Pitcher, G.C., Rabalais, N.N., Roman, M.R., Rose, K.A., Seibel, B.A., Telszewski, M., Yasuhara, M., Zhang, J., 2018. Declining oxygen in the global ocean and coastal waters. *Science* 359, eaam7240. <https://doi.org/10.1126/science.aam7240>
- Camacho-Jiménez, L., Leyva-Carrillo, L., Peregrino-Uriarte, A.B., Duarte-Gutiérrez, J.L., Tresguerres, M., Yepiz-Plascencia, G., 2019. Regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by hypoxia inducible factor 1 in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* during hypoxia and reoxygenation. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 235, 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.05.006>
- Camacho-Jiménez, L., Peregrino-Uriarte, A.B., Martínez-Quintana, J.A., Yepiz-Plascencia, G., 2018. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Molecular cloning, characterization and expression during hypoxia. *Mar. Environ. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.04.003>
- Cervellione, F., McGurk, C., Van den Broeck, W., 2017. “Perigastric organ”: a replacement name for the “hepatopancreas” of Decapoda. *J. Crustac. Biol.* 37, 353–355. <https://doi.org/10.1093/jcbiol/rux020>
- Chang, E.S., Thiel, M., 2015. Responses to environmental stresses: oxygen, temperature, and pH, in: *The Natural History of the Crustacea, Volume 4: Physiology*. Oxford University Press, 198 Madison Avenue, New York, NY 10016, pp. 320–390.
- Chausson, F., Regnault, M., 1995. Teneur en glycogène des branchies de *Carcinus maenas* (Crustacé, Décapode): Comparaison entre branchies antérieures et postérieures. *Cah Biol Mar* 36, 291–297.
- Chong-Robles, J., Charmantier, G., Boulo, V., Lizárraga-Valdéz, J., Enríquez-Paredes, L.M., Giffard-Mena, I., 2014. Osmoregulation pattern and salinity tolerance of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) during post-embryonic development. *Aquaculture* 422–423, 261–267. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.11.034>

- CONAPESCA, 2022. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2020. SAGARPA.
- Cota-Ruiz, K., Leyva-Carrillo, L., Peregrino-Uriarte, A.B., Valenzuela-Soto, E.M., Gollas-Galván, T., Gómez-Jiménez, S., Hernández, J., Yepiz-Plascencia, G., 2016. Role of HIF-1 on phosphofructokinase and fructose 1, 6-bisphosphatase expression during hypoxia in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 198, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.03.015>
- Cota-Ruiz, K., Peregrino-Uriarte, A.B., Felix-Portillo, M., Martínez-Quintana, J.A., Yepiz-Plascencia, G., 2015. Expression of fructose 1,6-bisphosphatase and phosphofructokinase is induced in hepatopancreas of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* by hypoxia. *Mar. Environ. Res.* 106, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.02.003>
- Cruz-Moreno, D.G., Yepiz-Plascencia, G., 2022. The pyruvate kinase of the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*: PK1 gene structure, expression, and enzyme activity during hypoxia. Datos no publicados.
- Diaz, R.J., 2001. Overview of hypoxia around the world. *J. Environ. Qual.* 30, 275–281.
- Dobson, L., Reményi, I., Tusnády, G.E., 2015. CCTOP: a Consensus Constrained TOPology prediction web server. *Nucleic Acids Res.* 43, W408–W412. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv451>
- Duarte-Gutiérrez, J., Peregrino-Uriarte, A.B., Gómez-Jiménez, S., Mata-Haro, V., Yepiz-Plascencia, G., 2021. HIF-1 is involved in the regulation of expression of metallothionein and apoptosis incidence in different oxygen conditions in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 262, 111072. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.111072>
- EEA, 2022. Oxygen concentrations in coastal and marine waters surrounding Europe. (accessed 10-10-2022) <https://www.eea.europa.eu/ims/oxygen-concentrations-in-coastal-and>
- Estrada-Cárdenas, P., Cruz-Moreno, D.G., González-Ruiz, R., Peregrino-Uriarte, A.B., Leyva-Carrillo, L., Camacho-Jiménez, L., Quintero-Reyes, I., Yepiz-Plascencia, G., 2021. Combined hypoxia and high temperature affect differentially the response of antioxidant enzymes, glutathione and hydrogen peroxide in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 254, 110909. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.110909>
- Fanjul-Moles, M.L., 2013. ROS signaling pathways and biological rhythms: perspectives in crustaceans. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 18, 665–675.
- FAO Fisheries & Aquaculture, 2022. Programa de información de especies acuáticas - *Penaeus vannamei* (Boone, 1931). (accessed 05-09-22) URL http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/es.
- Felix-Portillo, M., Martínez-Quintana, J.A., Arenas-Padilla, M., Mata-Haro, V., Gómez-Jiménez, S., Yepiz-Plascencia, G., 2016. Hypoxia drives apoptosis independently of p53 and metallothionein transcript levels in hemocytes of the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Chemosphere* 161, 454–462. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.041>
- Felix-Portillo, M., Martinez-Quintana, J.A., Peregrino-Uriarte, A.B., Yepiz-Plascencia, G., 2014. The metallothionein gene from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Characterization

and expression in response to hypoxia. *Mar. Environ. Res.* 101, 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.09.005>

- Flores-Sauceda, M.A., 2022. Caracterización molecular de las isoformas de la hexocinasa del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* y su expresión génica en hipoxia y reoxigenación (Tesis de Posgrado). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., Hermosillo, Sonora.
- García-Triana, A., Gómez-Jiménez, S., Peregrino-Uriarte, A.B., López-Zavala, A., González-Aguilar, G., Sotelo-Mundo, R.R., Valenzuela-Soto, E.M., Yepiz-Plascencia, G., 2010. Expression and silencing of Selenoprotein M (SelM) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: effect on peroxidase activity and hydrogen peroxide concentration in gills and hepatopancreas. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 155, 200–204. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.10.037>
- García-Triana, A., Peregrino-Uriarte, A.B., Yepiz-Plascencia, G., 2016. Selenoprotein M gene expression, peroxidases activity and hydrogen peroxide concentration are differentially regulated in gill and hepatopancreas of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* during hypoxia and reoxygenation. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 199, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.04.019>
- Gaxiola, G., Cuzon, G., García, T., Taboada, G., Brito, R., Chimal, M.E., Paredes, A., Soto, L., Rosas, C., van Wormhoudt, A., 2005. Factorial effects of salinity, dietary carbohydrate and moult cycle on digestive carbohydrases and hexokinases in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 140, 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2004.10.018>
- Ghaffari, N., Sanchez-Flores, A., Doan, R., Garcia-Orozco, K.D., Chen, P.L., Ochoa-Leyva, A., Lopez-Zavala, A.A., Carrasco, J.S., Hong, C., Briebe, L.G., Rudiño-Piñera, E., Blood, P.D., Sawyer, J.E., Johnson, C.D., Dindot, S.V., Sotelo-Mundo, R.R., Criscitiello, M.F., 2014. Novel transcriptome assembly and improved annotation of the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), a dominant crustacean in global seafood mariculture. *Sci. Rep.* 4, 7081. <https://doi.org/10.1038/srep07081>
- Ghosh, A., Shieh, J.-J., Pan, C.-J., Sun, M.-S., Chou, J.Y., 2002. The Catalytic Center of Glucose-6-phosphatase His176 is the nucleophile forming the phosphohistidine-enzyme intermediate during catalysis. *J. Biol. Chem.* 277, 32837–32842. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201853200>
- Giraud-Billoud, M., Rivera-Ingraham, G.A., Moreira, D.C., Burmester, T., Castro-Vazquez, A., Carvajalino-Fernández, J.M., Dafre, A., Niu, C., Tremblay, N., Paital, B., Rosa, R., Storey, J.M., Vega, I.A., Zhang, W., Yepiz-Plascencia, G., Zenteno-Savin, T., Storey, K.B., Hermes-Lima, M., 2019. Twenty years of the ‘Preparation for Oxidative Stress’ (POS) theory: Ecophysiological advantages and molecular strategies. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 234, 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.04.004>
- Godoy-Lugo, J.A., Miranda-Cruz, M.M., Rosas-Rodríguez, J.A., Adan-Bante, N.P., Icedo-García, R., Soñanez-Organis, J.G., 2019. Hypoxia inducible factor –1 regulates WSSV-induced glycolytic genes in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 92, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.05.040>
- González-Ruiz, R., Granillo-Luna, O.N., Peregrino-Uriarte, A.B., Gómez-Jiménez, S., Yepiz-Plascencia, G., 2020. Mitochondrial manganese superoxide dismutase from the shrimp

- Litopenaeus vannamei*: Molecular characterization and effect of high temperature, hypoxia and reoxygenation on expression and enzyme activity. J. Therm. Biol. 88, 102519. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102519>
- Gorr, T.A., Cahn, J.D., Yamagata, H., Bunn, H.F., 2004. Hypoxia-induced Synthesis of Hemoglobin in the Crustacean *Daphnia magna* Is Hypoxia-inducible Factor-dependent. J. Biol. Chem. 279, 36038–36047. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403981200>
- Granillo-Luna, O.N., Hernandez-Aguirre, L.E., Peregrino-Uriarte, A.B., Duarte-Gutierrez, J., Contreras-Vergara, C.A., Gollas-Galvan, T., Yepiz-Plascencia, G., 2022. The anaplerotic pyruvate carboxylase from white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Gene structure, molecular characterization, protein modelling and expression during hypoxia. Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 269, 111212. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2022.111212>
- Guionie, O., Clottes, E., Stafford, K., Burchell, A., 2003. Identification and characterisation of a new human glucose-6-phosphatase isoform. FEBS Lett. 551, 159–164.
- Hah, J.S., Ryu, J., Lee, W., Jung, C.Y., Lachal, M., 2002. The hepatocyte glucose-6-phosphatase subcomponent T3: its relationship to GLUT2. Biochim. Biophys. Acta 1564, 198–206.
- Han, S., Wang, M., Liu, M., Wang, B., Jiang, K., Wang, L., 2018. Comparative sensitivity of the hepatopancreas and midgut in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* to oxidative stress under cyclic serious/medium hypoxia. Aquaculture 490, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.021>
- Hermes-Lima, M., Moreira, D.C., Rivera-Ingraham, G.A., Giraud-Billoud, M., Genaro-Mattos, T.C., Campos, É.G., 2015. Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: Revisiting the proposal two decades later. Free Radic. Biol. Med. 89, 1122–1143. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.156>
- Hermes-Lima, M., Zenteno-Savín, T., 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 133, 537–556. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00080-7](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00080-7)
- Hernández R., M., Bückle R., L.F., Palacios, E., Barón S., B., 2006. Preferential behavior of white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) by progressive temperature–salinity simultaneous interaction. J. Therm. Biol. 31, 565–572. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2006.05.008>
- Hernández-Aguirre, L.E., Cota-Ruiz, K., Peregrino-Uriarte, A.B., Gómez-Jiménez, S., Yepiz-Plascencia, G., 2021. The gluconeogenic glucose-6-phosphatase gene is expressed during oxygen-limited conditions in the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: Molecular cloning, membrane protein modeling and transcript modulation in gills and hepatopancreas. J. Bioenerg. Biomembr. <https://doi.org/10.1007/s10863-021-09903-6>
- Hernández-Palomares, M.L.E., Godoy-Lugo, J.A., Gómez-Jiménez, S., Gámez-Alejo, L.A., Ortiz, R.M., Muñoz-Valle, J.F., Peregrino-Uriarte, A.B., Yepiz-Plascencia, G., Rosas-Rodríguez, J.A., Soñanez-Organis, J.G., 2018. Regulation of lactate dehydrogenase in response to WSSV infection in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol. 74, 401–409. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.01.011>
- Hutton, J.C., O'Brien, R.M., 2009. Glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene family. J. Biol. Chem. 284, 29241–29245. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.025544>

- INAPESCA, 2018. Acuicultura Camarón blanco del Pacífico. (Accessed 11-10-22) <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuicultura-camaron-blanco-del-pacifico>
- Jimenez-Gutierrez, L.R., Uribe-Carvajal, S., Sanchez-Paz, A., Chimeo, C., Muhlia-Almazan, A., 2014. The cytochrome c oxidase and its mitochondrial function in the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* during hypoxia. J. Bioenerg. Biomembr. 46, 189–196. <https://doi.org/10.1007/s10863-013-9537-5>
- Jin, J., Médale, F., Kamalam, B.S., Aguirre, P., Véron, V., Panserat, S., 2014a. Comparison of Glucose and Lipid Metabolic Gene Expressions between Fat and Lean Lines of Rainbow Trout after a Glucose Load. PLOS ONE 9, e105548. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105548>
- Jin, J., Panserat, S., Kamalam, B.S., Aguirre, P., Véron, V., Médale, F., 2014b. Insulin regulates lipid and glucose metabolism similarly in two lines of rainbow trout divergently selected for muscle fat content. Gen. Comp. Endocrinol. 204, 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.04.027>
- Jitrapakdee, S., 2012. Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. Int. J. Biochem. Cell Biol. 44, 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.10.001>
- Ke, Q., Costa, M., 2006. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). Mol. Pharmacol. 70, 1469–1480. <https://doi.org/10.1124/mol.106.027029>
- Klumpen, E., Hoffschroer, N., Zeis, B., Gigengack, U., Dohmen, E., Paul, R.J., 2017. Reactive oxygen species (ROS) and the heat stress response of *Daphnia pulex*: ROS-mediated activation of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and heat shock factor 1 (HSF-1) and the clustered expression of stress genes. Biol. Cell 109, 39–64. <https://doi.org/10.1111/boc.201600017>
- Kniffin, C.D., Burnett, L.E., Burnett, K.G., 2014. Recovery from hypoxia and hypercapnic hypoxia: Impacts on the transcription of key antioxidants in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 170, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.01.006>
- Kodama, K., Rahman, Md.S., Horiguchi, T., Thomas, P., 2012. Assessment of hypoxia-inducible factor-1 α mRNA expression in mantis shrimp as a biomarker of environmental hypoxia exposure. Biol. Lett. 8, 278–281. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2011.0887>
- Laramore, S., Laramore, C.R., Scarpa, J., 2001. Effect of Low Salinity on Growth and Survival of Postlarvae and Juvenile *Litopenaeus vannamei*. J. World Aquac. Soc. 32, 385–392. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2001.tb00464.x>
- Li, T., Brouwer, M., 2007. Hypoxia-inducible factor, gsHIF, of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*: Molecular characterization and response to hypoxia. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 147, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.12.018>
- Lord-Dufour, S., Copland, I.B., Levros, L.-C., Post, M., Das, A., Khosla, C., Galipeau, J., Rassart, E., Annabi, B., 2009. Evidence for Transcriptional Regulation of the Glucose-6-Phosphate Transporter by HIF-1 α : Targeting G6PT with Mumbaistatin Analogs in Hypoxic Mesenchymal Stromal Cells. STEM CELLS 27, 489–497.

<https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0855>

- Marandel, L., Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Arbenoits, E., Soengas, J.L., Bobe, J., 2017. Evolutionary history of glucose-6-phosphatase encoding genes in vertebrate lineages: towards a better understanding of the functions of multiple duplicates. *BMC Genomics* 18, 342. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3727-1>
- Marcolongo, P., Fulceri, R., Gamberucci, A., Czegle, I., Banhegyi, G., Benedetti, A., 2013. Multiple roles of glucose-6-phosphatases in pathophysiology: state of the art and future trends. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 2608–2618. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.12.013>
- Martínez-Quintana, J.A., Kikuta, S., Felix-Portillo, M., Peregrino-Uriarte, A.B., Yepiz-Plascencia, G., 2015. A novel functional glucose transporter in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* -LvGLUT2- is up-regulated during hypoxia in hepatopancreas. *Mar. Environ. Res.* 112, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.09.007>
- Martínez-Quintana, J.A., Peregrino-Uriarte, A.B., Gollas-Galván, T., Gómez-Jiménez, S., Yepiz-Plascencia, G., 2014. The glucose transporter 1 -GLUT1- from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* is up-regulated during hypoxia. *Mol. Biol. Rep.* 41, 7885–7898. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3682-8>
- Martins, T.L., Chittó, A.L.F., Rossetti, C.L., Brondani, C.K., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M., 2011. Effects of hypo- or hyperosmotic stress on lipid synthesis and gluconeogenic activity in tissues of the crab *Neohelice granulata*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 158, 400–405. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.11.023>
- Metón, I., Caseras, A., Fernández, F., Baanante, I.V., 2004. Molecular cloning of hepatic glucose-6-phosphatase catalytic subunit from gilthead sea bream (*Sparus aurata*): response of its mRNA levels and glucokinase expression to refeeding and diet composition. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 138, 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.03.004>
- Millard, R.S., Ellis, R.P., Bateman, K.S., Bickley, L.K., Tyler, C.R., van Aerle, R., Santos, E.M., 2021. How do abiotic environmental conditions influence shrimp susceptibility to disease? A critical analysis focussed on White Spot Disease. *J. Invertebr. Pathol.* 186, 107369. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107369>
- Nakaoka, H.J., Hara, T., Yoshino, S., Kanamori, A., Matsui, Y., Shimamura, T., Sato, H., Murakami, Y., Seiki, M., Sakamoto, T., 2016. NECAB3 Promotes Activation of Hypoxia-inducible factor-1 during Normoxia and Enhances Tumourigenicity of Cancer Cells. *Sci. Rep.* 6. <https://doi.org/10.1038/srep22784>
- Nordlie, R.C., Foster, J.D., 2010. A retrospective review of the roles of multifunctional glucose-6-phosphatase in blood glucose homeostasis: Genesis of the tuning/retuning hypothesis. *Life Sci.* 87, 339–349. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.06.021>
- Nuñez-Hernandez, D.M., Felix-Portillo, M., Peregrino-Uriarte, A.B., Yepiz-Plascencia, G., 2018. Cell cycle regulation and apoptosis mediated by p53 in response to hypoxia in hepatopancreas of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Chemosphere* 190, 253–259. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.09.131>
- Oh, K.-J., Han, H.-S., Kim, M.-J., Koo, S.-H., 2013. Transcriptional regulators of hepatic

gluconeogenesis. Arch. Pharm. Res. 36, 189–200. <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0018-5>

- Pan, M., Zhang, Y., Deng, K., Liu, G., Gu, Z., Liu, J., Luo, K., Zhang, W., Mai, K., 2019. Forkhead box O1 in turbot *Scophthalmus maximus*: Molecular characterization, gene structure, tissue distribution and the role in glucose metabolism. Gene 708, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.03.065>
- Panserat, S., Capilla, E., Gutierrez, J., Frappart, P.O., Vachot, C., Plagnes-Juan, E., Aguirre, P., Brèque, J., Kaushik, S., 2001. Glucokinase is highly induced and glucose-6-phosphatase poorly repressed in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a single meal with glucose. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 128, 275–283. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(00\)00322-5](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(00)00322-5)
- Parrilla-Taylor, D.P., Zenteno-Savín, T., 2011. Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation. Aquaculture 318, 379–383. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.05.015>
- Pascual, C., Gaxiola, G., Rosas, C., 2003. Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species. Mar. Biol.
- Pérez-Rostro, C.I., Racotta, I.S., Ibarra, A.M., 2004. Decreased genetic variation in metabolic variables of *Litopenaeus vannamei* shrimp after exposure to acute hypoxia. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 302, 189–200. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2003.10.010>
- Pinem, R.T., Sarida, M., 2022. The growth performance of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured at various salinity conditions using single step acclimation 15, 6.
- Ponce-Palafox, J., Martinez-Palacios, C.A., Ross, L.G., 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. Aquaculture 157, 107–115. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00148-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00148-8)
- Ponce-Palafox, J.T., Pavia, Á.A., Mendoza López, D.G., Arredondo-Figueroa, J.L., Lango-Reynoso, F., Castañeda-Chávez, M. del R., Esparza-Leal, H., Ruiz-Luna, A., Páez-Ozuna, F., Castillo-Vargasmachuca, S.G., Peraza-Gómez, V., 2019. Response surface analysis of temperature-salinity interaction effects on water quality, growth and survival of shrimp *Penaeus vannamei* postlarvae raised in biofloc intensive nursery production. Aquaculture 503, 312–321. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.01.020>
- Reyes-Ramos, C.A., Peregrino-Uriarte, A.B., Cota-Ruiz, K., Valenzuela-Soto, E.M., Leyva-Carrillo, L., Yepiz-Plascencia, G., 2018. Phosphoenolpyruvate carboxykinase cytosolic and mitochondrial isoforms are expressed and active during hypoxia in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 226, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2018.08.001>
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Pascual, C., Brito, R., Chimal, M.E., Worhoudt, A.V., 2000. El metabolismo de los carbohidratos de *Litopenaeus setiferus*, *L. vannamei* y *L. stylirostris*. Av. En Nutr. Acuicola.
- Rosas, C., López, N., Mercado, P., Martínez, E., 2001. Effect of Salinity Acclimation on Oxygen Consumption of Juveniles of the White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. J. Crustac. Biol. 21, 912–922. <https://doi.org/10.1163/20021975-99990183>

- Rosas, C., Martinez, E., Gaxiola, G., Brito, R., Sánchez, A., Soto, L.A., 1999. The effect of dissolved oxygen and salinity on oxygen consumption, ammonia excretion and osmotic pressure of *Penaeus setiferus* (Linnaeus) juveniles. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 234, 41–57. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(98\)00139-7](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(98)00139-7)
- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Hernández-López, J., Muhlia-Almazán, A., Yepiz-Plascencia, G., 2007. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 340, 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.09.006>
- Scholnick, D.A., Barabas, A.E., Cowan, S.S., 2006. The Influence of Chloride on Glucose Export in Marine Crabs: Sensitivity of Glucose-6-Phosphatase to Chloride Ion. J. Crustac. Biol. 26, 510–514. <https://doi.org/10.1651/S-2669a.1>
- Semenza, G.L., 2007. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ. 2007, cm8. <https://doi.org/10.1126/stke.4072007cm8>
- Soñanez-Organis, J.G., Peregrino-Uriarte, A.B., Gómez-Jiménez, S., López-Zavala, A., Forman, H.J., Yepiz-Plascencia, G., 2009. Molecular characterization of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and tissue-specific expression under hypoxia. Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. CBP 150, 395–405. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.06.005>
- Soñanez-Organis, J.G., Peregrino-Uriarte, A.B., Sotelo-Mundo, R.R., Forman, H.J., Yepiz-Plascencia, G., 2011. Hexokinase from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: cDNA sequence, structural protein model and regulation via HIF-1 in response to hypoxia. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 158, 242–249. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.12.006>
- Soñanez-Organis, J.G., Racotta, I.S., 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*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 393, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.06.031>
- Soñanez-Organis, J.G., Rodriguez-Armenta, M., Leal-Rubio, B., Peregrino-Uriarte, A.B., Gómez-Jiménez, S., Yepiz-Plascencia, G., 2012. Alternative splicing generates two lactate dehydrogenase subunits differentially expressed during hypoxia via HIF-1 in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. Biochimie 94, 1250–1260. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.02.015>
- Soty, M., Chilloux, J., Casteras, S., Grichine, A., Mithieux, G., Gautier-Stein, A., 2012. New insights into the organisation and intracellular localisation of the two subunits of glucose-6-phosphatase. Biochimie 94, 695–703. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.09.022>
- Stramma, L., Schmidtke, S., 2019. 2.1 Global evidence of ocean deoxygenation 14.
- Stukey, J., Carman, G.M., 1997. Identification of a novel phosphatase sequence motif. Protein Sci. Publ. Protein Soc. 6, 469–472.
- Sun, S., Fu, H., Zhu, J., Ge, X., Wu, X., Qiao, H., Jin, S., Zhang, W., Sun, S., Fu, H., Zhu, J., Ge, X., Wu, X., Qiao, H., Jin, S., Zhang, W., 2018. Molecular Cloning and Expression Analysis of Lactate Dehydrogenase from the Oriental River Prawn *Macrobrachium nipponense* in Response to Hypoxia. Int. J. Mol. Sci. 19, 1990. <https://doi.org/10.3390/ijms19071990>

- Sun, S., Xuan, F., Fu, H., Zhu, J., Ge, X., 2017. Molecular Cloning and Functional Characterization of a Hexokinase from the Oriental River Prawn *Macrobrachium nipponense* in Response to Hypoxia. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18061256>
- Surholt, B., Newsholme, E.A., 1981. Maximum activities and properties of glucose 6-phosphatase in muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem. J.* 198, 621–629. <https://doi.org/10.1042/bj1980621>
- Thabrew, M.I., Poat, P.C., Munday, K.A., 1971. Carbohydrate metabolism in *Carcinus maenas* gill tissue. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* 40, 531–541. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(71\)90238-0](https://doi.org/10.1016/0305-0491(71)90238-0)
- Trandaburu, T., 1977. Fine structural localization of glucose-6-phosphatase activity in the pancreatic islets of two amphibian species (*Salamandra salamandra* L. and *Rana esculenta* L.). *Acta Histochem.* 59, 246–253. [https://doi.org/10.1016/S0065-1281\(77\)80046-9](https://doi.org/10.1016/S0065-1281(77)80046-9)
- Trasviña-Arenas, C.H., Garcia-Triana, A., Peregrino-Uriarte, A.B., Yepiz-Plascencia, G., 2013. White shrimp *Litopenaeus vannamei* catalase: gene structure, expression and activity under hypoxia and reoxygenation. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 164, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2012.10.004>
- Ulaje, S.A., Rojo-Arreola, L., Lluch-Cota, S.E., Ascencio, F., Cruz-Hernández, P., Sicard, M.T., 2019. Gene expression and energetic metabolism changes in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to short-term hypoxia. *Aquac. Res.* 50, 994–1004. <https://doi.org/10.1111/are.13960>
- van Schaftingen, E., Gerin, I., 2002. The glucose-6-phosphatase system. *Biochem. J.* 362, 513–532.
- Vaquer-Sunyer, R., Duarte, C.M., 2008. Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 15452–15457. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803833105>
- Wang, Y., Wang, H., Li, M., Gao, Z., Zhang, S., 2015. Identification, expression and regulation of amphioxus G6Pase gene with an emphasis on origin of liver. *Gen. Comp. Endocrinol.* 214, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.12.021>
- Wannamaker, C.M., Rice, J.A., 2000. Effects of hypoxia on movements and behavior of selected estuarine organisms from the southeastern United States. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 249, 145–163. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(00\)00160-X](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(00)00160-X)
- Werve, G. van de, Lange, A., Newgard, C., Méchin, M.-C., Li, Y., Berteloot, A., 2000. New lessons in the regulation of glucose metabolism taught by the glucose 6-phosphatase system. *Eur. J. Biochem.* 267, 1533–1549. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01160.x>
- Yun, Z., Maecker, H.L., Johnson, R.S., Giaccia, A.J., 2002. Inhibition of PPAR γ 2 Gene Expression by the HIF-1-Regulated Gene DEC1/Stra13: A Mechanism for Regulation of Adipogenesis by Hypoxia. *Dev. Cell* 2, 331–341. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00131-4](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00131-4)
- Zacarias-Soto, M.R., 1997. Histología del estómago, corazón, hígado y riñón de *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindacher, 1869), y sus modificaciones ante situaciones de estrés crónico (Tesis de Posgrado). U.A.B.C.S., La Paz, B.C.S. México.
- Zhang, Xiaojun, Yuan, J., Sun, Y., Li, S., Gao, Y., Yu, Y., Liu, C., Wang, Q., Lv, X., Zhang, Xiaoxi, Ma, K.Y., Wang, X., Lin, W., Wang, Long, Zhu, X., Zhang, C., Zhang, J., Jin, S.,

- Yu, K., Kong, J., Xu, P., Chen, J., Zhang, H., Sorgeloos, P., Sagi, A., Alcivar-Warren, A., Liu, Z., Wang, Lei, Ruan, J., Chu, K.H., Liu, B., Li, F., Xiang, J., 2019. Penaeid shrimp genome provides insights into benthic adaptation and frequent molting. *Nat. Commun.* 10, 356. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08197-4>
- Zhang, Y., Zhang, Z., Liang, X.-F., He, S., Li, L., Xu, J., Li, J., Alam, M.S., 2021. Response of g6p homologous genes in Chinese perch to high-carbohydrate diets. *Aquac. Rep.* 19, 100581. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100581>
- Zhang, Z., Yan, J., Chang, Y., Yan, S.S., Shi, H., 2011. Hypoxia Inducible Factor-1 as a Target for Neurodegenerative Diseases. *Curr. Med. Chem.* 18, 4335–4343.
- Zhao, T., Zhu, Y., Morinibu, A., Kobayashi, M., Shinomiya, K., Itasaka, S., Yoshimura, M., Guo, G., Hiraoka, M., Harada, H., 2014. HIF-1-mediated metabolic reprogramming reduces ROS levels and facilitates the metastatic colonization of cancers in lungs. *Sci. Rep.* 4. <https://doi.org/10.1038/srep03793>.