CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

”Expresión de genes de rutas metabólicas involucradas en la respuesta a estrés por hipertermia e hipoxia a corto y largo plazo en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*)"

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

(Orientación Acuicultura)

P r e s e n t a

SERGIO ALAN ULAJE FERNÁNDEZ

La Paz, Baja California Sur, Enero de 2020

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13:00 horas del día 19 del Mes de Diciembre del 2019, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Expresión de genes de rutas metabólicas involucradas en la respuesta a estrés por hipertermia e hipoxia a corto y largo plazo en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*)"

Presentada por el alumno:

Sergio Alan Ulaje Fernández

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Acuicultura**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Dra. María Teresa Sicard González
Co-Director de Tesis

Dra. Liliana Carolina Rojo Arreola
Co-Director de Tesis

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Co-Tutor

Dr. Pedro Cruz Hernández
Co-Tutor

Dr. Salvador Emilio Lluch Cota
Co-Tutor

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

Conformación de Comités

Comité tutorial

Dra. Maria Teresa Sicard González
Centro de Investigaciones Biológicas del Nororeste, S.C.
Co-Directora de Tesis

Dra. Liliana Carolina Rojo Arreola
Centro de Investigaciones Biológicas del Nororeste, S.C.
Co-Directora de Tesis

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Centro de Investigaciones Biológicas del Nororeste, S.C.
Co-Tutor

Dr. Pedro Cruz Hernández
Centro de Investigaciones Biológicas del Nororeste, S.C.
Co-Tutor

Dr. Salvador Emilio Lluch Cota
Centro de Investigaciones Biológicas del Nororeste, S.C.
Co-Tutor

Comité revisor de tesis

Dra. María Teresa Sicard González
Dra. Liliana Carolina Rojo Arreola
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Dr. Pedro Cruz Hernández
Dr. Salvador Emilio Lluch Cota

Jurado de examen

Dra. María Teresa Sicard González
Dra. Liliana Carolina Rojo Arreola
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Dr. Pedro Cruz Hernández
Dr. Salvador Emilio Lluch Cota

Suplentes

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov
Dr. Teodoro Reynoso Granados

Resumen

En los últimos años, la camaronicultura en México ha reportado pérdidas (mortalidades) asociadas principalmente a enfermedades, densidad y estrés ambiental. En penéidos, la compensación del estrés provocado por hipertermia e hipoxia está relacionada con la capacidad de modificar la transcripción de genes de diferentes rutas metabólicas involucradas en la obtención de energía. El presente trabajo se enfocó en relacionar la respuesta de juveniles de *L. vannamei* bajo estrés por hipertermia e hipoxia, primero mediante el análisis de su termotolerancia ante el estrés combinado de hipertermia e hipoxia, y después con un análisis de la expresión de genes del ciclo de Krebs (TCA) y metabolismo de carbohidratos (CHO), lípidos (LIP) y aminoácidos (AA); tanto en el corto como en el largo plazo. El nivel de hipoxia utilizado en este estudio (2 mgO_2/L) disminuyó la tolerancia térmica de *L. vannamei*, en temperaturas de 36 a 39 °C, sin afectar su tolerancia por debajo o arriba de estos niveles. En el corto plazo, se encontró que los organismos responden modificando la expresión de genes de glucólisis anaerobia y TCA; además, las comparaciones muestran que los organismos utilizan la integración de estas respuestas como estrategia para obtener energía "rápida" para sobreponerse al estrés súbito. Por otro lado, durante la exposición cíclica de manera crónica a temperatura, los resultados mostraron en los primeros 5 días, la expresión del 70% de los genes cuantificados se reguló negativamente, a los 14 días el 65% de los genes regreso a valores similares a los basales (control), y después de 24 días se observó la sobreexpresión del 50% de los genes cuantificados. En cuanto a la respuesta a hipoxia cíclica, en el día 2, la expresión del 50% de los genes cuantificados se reguló negativamente, a los 14 días el 70% de los genes volvió a la expresión basal, y después de 24 días se observó la sobreexpresión del 27% de los genes cuantificados. Lo anterior, sugiere que, ante situaciones de estrés por hipertermia e hipoxia, estos organismos presentan cambios en los mecanismos de compensación a lo largo del tiempo que se ven reflejados en los patrones de expresión génica. En conclusión, se encontró que la hipoxia disminuye la termotolerancia de *L. vannamei* en temperaturas cercanas a su límite térmico superior y, además, que las variaciones en el uso y obtención de energía metabólica por *L. vannamei* dependen del tipo y duración del estrés provocado, observando que utilizan como energía CHO en la respuesta aguda y realizan la integración de diferentes rutas metabólicas para la obtención de energía en la respuesta crónica.

Palabras Claves: Hipoxia, Hipertermia, Metabolismo, qPCR, *L. vannamei*.

Vo. Bo.

Dra. María Teresa Sicard González

Dra. Liliana Carolina Rojo Arreola

Summary

In recent years, shrimp farming in Mexico has reported losses (mortalities) mainly associated with diseases, density and environmental stress. In peneids, the compensation of stress caused by hyperthermia and hypoxia is related to the ability to modify the transcription of genes of metabolic pathways involved in energy gain. The present work focused on relating the response of *L. vannamei* juveniles under hyperthermia and hypoxia stress, first by analyzing their thermotolerance to the combined stress of hyperthermia and hypoxia, and then with an expression analysis of the of Krebs cycle (TCA), carbohydrate (CHO), lipid (LIP) and amino acid (AA) metabolism genes; both in the short and long term. The hypoxia level used in this study (2 mgO_2/L) decreased the thermal tolerance of *L. vannamei*, at temperatures from 36 to 39 °C, without affecting its tolerance below or above these levels. In the short term, hyperthermia and hypoxia caused a modification the expression of anaerobic glycolysis genes and TCA, when tissue metabolites are taken into account, the integration of these responses as a strategy to obtain “fast” energy to cope with acute stress is revealed. On the other hand, long-term cyclic exposure to temperature, the expression of 70% of the quantified genes was negatively regulated in the first 5 days, at day 14 65% of the genes returned to values similar to basal expression (control), and after 24 days the overexpression of 50% of the quantified genes was observed. As for long-term cyclic hypoxia, on day 2 the expression of 50% of the quantified genes was regulated negatively, at day 14 70% of the genes returned to baseline expression, and after 24 days the overexpression of 27% of the quantified genes was observed. These results suggest that under hyperthermia and hypoxia stress, *L. vannamei* suffer a gene expression re-arrangement as a compensation mechanism. In conclusion, hypoxia was found to decrease the thermotolerance of *L. vannamei* at temperatures close to its tolerance limits; and also, the gain and use of metabolic energy by *L. vannamei* depend on the type and length of the stress, being CHO the main energy source in the short-term response and an integration of different metabolic pathways for obtaining energy in the long-term.

Keywords: Hypoxia, Hyperthermia, Metabolism, qPCR, *L. vannamei*.

Vo. Bo.

Dra. María Teresa Sicard González

Dra. Liliana Carolina Rojo Arreola

"El amor no idolátrico a una idea o a una persona
es sereno, no estridente;
es tranquilo y profundo;
nace a cada instante, pero no es delirio.
No es embriaguez,
ni lleva a la abnegación,
sino que nace de la superación del yo."

Erich Fromm

Para Perla y Leo,
el amor de mi vida y la luz en mi corazón

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste por el soporte recibido para la realización de este trabajo y la colaboración de su calificado personal que me brindó apoyo científico, formativo y social.

Al CONACYT por la beca de Doctorado otorgada con el número de alumno 281051, la cual permitió mi soporte durante mis cursos y la realización de este trabajo.

Al proyecto de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) por el financiamiento del presente estudio mediante el proyecto "Aplicación de la genómica funcional como estrategia para la mejora continua el Camarón" (número 126427), módulo de Ecofisiología.

En particular y muy especialmente a mis co-directoras de tesis Dra. María Teresa Sicard González y Dra. Liliana Carolina Rojo Arreola por su paciencia, confianza, dirección, amistad y cariño para la elaboración del presente documento.

A mis asesores y miembros de mi comité tutorial Dr. Salvador Emilio Lluch Cota, Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle y Dr. Pedro Cruz Hernández por el gran apoyo, consejos y asistencia en la culminación del presente trabajo.

Al personal técnico del Laboratorio de Ecofisiología de Organismos Acuáticos, M.C. Rosa Linda Salgado García, M.C. Gilberto González Soriano, M.C. Rosa Isela Vázquez Sánchez y al Ing. Julio Egrén Félix Domínguez por su invaluable amistad y colaboración en el montaje de sistemas, entrenamiento técnico en el uso de los mismos y apoyo en el desarrollo experimental realizado.

A María de los Ángeles Navarrete del Toro, del Laboratorio de Bioquímica por su apoyo técnico en el procesamiento de muestras y compartir su experiencia.

Al personal de Posgrado Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro, Lic. Osvelia Ibarra Morales, Lic. Leticia González Rubio Rivera, Tania Verónica Núñez Valdez y biblioteca Ana María Talamantes Cota, Susana Luna García, Elizabeth Guadalupe Sánchez Vázquez y María Esther Ojeda Castro por su apoyo, amabilidad y disponibilidad en todas mis consultas.

A los compañeros que siempre me apoyaron cuando necesite ayuda moral y académica Roberto, Pavel, Carolina, Héctor, Eliza, Tito, Roy, Ramiro, Jorge, Iveett y Samuel.

A mi esposa Perla, mi hijo Leo, mis padres Sergio y Estela, hermana Estrella, primos Daniel e Itzá y gran familia a la cual pertenezco.

Contenido

Resumen I

Summary II

Dedicatoria III

Agradecimientos IV

Contenido V

Lista de figuras VIII

Lista de tablas XI

1. INTRODUCCIÓN 1

2. ANTECEDENTES 6

2.1. Generalidades del camarón blanco 6

2.2. Estrés por hipertermia e hipoxia 6

2.3. Tolerancia térmica de *L. vannamei* 8

2.4. Respuestas globales del organismo a hipertermia e hipoxia en crustáceos 10

2.5. Cambios en concentración de metabolitos en tejidos por efecto de hipertermia e hipoxia en crustáceos 11

2.6. Cambios en la expresión génica 12

2.6.1. Efecto de la hipertermia 13

2.6.2. Efecto de la hipoxia 14

2.6.3. Efecto combinado de la hipertermia e hipoxia 17

3. JUSTIFICACIÓN 19

4. HIPOTESIS 19

5. OBJETIVOS 20

5.1. General 20

5.2. Específicos 20

6. MATERIALES Y METODOS 21

6.1. Organismos experimentales 21

6.2. Termotolerancia de PL de *L. vannamei* a hipertermia e hipoxia 22

6.3. Bioensayo para determinar los cambios en expresión génica de *L. vannamei* ante condiciones de hipertermia e hipoxia 23

6.4. Análisis de la expresión génica 26
6.4.1. Genes de referencia 26
6.4.2. Selección de genes blanco 27
6.4.3. Genes del metabolismo anaerobio 28
6.4.4. Diseño de oligonucleótidos para qPCR 28
6.4.5. Extracción de ARN 29
6.4.6. Tratamiento con ADNasa y obtención de ADNc 30
6.4.7. Estandarización de la eficiencia de amplificación por qPCR 30
6.4.8. Cuantificación de expresión génica por qPCR 31
6.4.9. Análisis de expresión génica global 32
6.5 Análisis Estadísticos 32
7. RESULTADOS 33
7.1. Termotolerancia de PL de *L. vannamei* a hipertermia e hipoxia 33
7.2. Selección de genes para análisis por qPCR 34
7.2.1. Genes de referencia 34
7.2.2. Retos Agudos 34
7.2.3. Reto crónico 35
7.3. Diseño de oligonucleótidos cebadores 38
7.3.1. Genes de rutas metabólicas 38
7.3.2. Metabolismo anaerobio 41
7.4. Análisis de expresión génica de retos agudos 42
7.4.1. Metabolismo de carbohidratos 42
7.4.2. Metabolismo de lípidos 43
7.4.3. Metabolismo de nucleótidos 45
7.4.4. Ciclo de Krebs 46
7.4.5. Metabolismo anaerobio 48
7.4.6. Integración de variables 49
7.5. Análisis de expresión génica reto crónico 50
7.5.1. Metabolismo de carbohidratos 50
7.5.2. Metabolismo de lípidos 52
7.5.3. Ciclo de Krebs 53
7.5.4. Metabolismo de aminoácidos 54

7.5.5. Metabolismo del fosfágeno arginina quinasa 56
7.5.6. Metabolismo anaerobio 57
7.5.7. Proteínas de choque térmico HSP70 y HSP90 59
7.5.8. Análisis de expresión génica global 60
8. DISCUSIÓN 61
8.1. Tolerancia térmica de PL de *L. vannamei* a condiciones combinadas de hipertermia e hipoxia 61
8.2. Cambios en la expresión génica en respuesta a hipertermia e hipoxia 62
8.2.1. Respuesta a hipertermia aguda 63
8.2.2. Respuesta a hipoxia aguda 65
8.2.3. Respuesta crónica 71
9. CONCLUSIONES 80
10. LITERATURA CITADA 81
ANEXO 99
A1. Artículo publicado 99
A2. Artículo sometido 100

Lista de figuras

Figura 01. Patrones de variación diarios de oxígeno disuelto (línea solida) y temperatura (línea punteada), registrados en estanques de cultivo de camarón durante los periodos de mayor mortalidad, en Sinaloa, Sonora y Nayarit. 3

Figura 02. Registro de temperatura al que fueron expuestos juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) de 11 g de peso, durante el cambio agudo. 24

Figura 03. Registro de oxígeno disuelto al que fueron expuestos los juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) de 11 g de peso, durante el cambio agudo. 25

Figura 04. Registro de las oscilaciones térmicas (línea gruesa) y de oxígeno (línea delgada) disuelto a las que fueron expuestos organismos juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) de 11 g de peso, para evaluar la respuesta crónica a 28 días. 25

Figura 05. Temperatura letal media (LT_{50}, nivel al que ocurre el 50% de la mortalidad) de PL de camarón blanco (*L. vannamei*) para diferentes tiempos de exposición. 33

Figura 06. Expresión de genes del metabolismo de carbohidratos en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. 42

Figura 07. Expresión de genes del metabolismo de carbohidratos en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. 43

Figura 08. Expresión de genes del metabolismo de lípidos en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. 44

Figura 09. Expresión de genes del metabolismo de lípidos en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. 44

Figura 10. Expresión de genes del metabolismo de nucleótidos en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. 45

Figura 11. Expresión de genes del metabolismo de nucleótidos en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. 46

Figura 12. Expresión de genes del ciclo de Krebs en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. 47

Figura 13. Expresión de genes del ciclo de Krebs en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. 47

Figura 14. Expresión de genes de glucolisis anaerobia en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. 48

Figura 15. Expresión de genes de las subunidades del factor inducido por hipoxia (HIF) en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. 49

Figura 16. Análisis factorial por el método de componentes principales con rotación varimax para contenido de carbohidratos y expresión génica en tejidos de *L. vannamei* bajo hipoxia a corto plazo. 50

Figura 17. Expresión de genes del metabolismo de carbohidratos en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico de hipertermia e hipoxia. 51

Figura 18. Expresión de genes del metabolismo de lípidos en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico de hipertermia e hipoxia. 52

Figura 19. Expresión de genes del ciclo de Krebs en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico de hipertermia e hipoxia. 53

Figura 20. Expresión de genes del metabolismo de aminoácidos en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico de hipertermia e hipoxia. 54

Figura 21. Expresión de los genes citosólico (GOT1) y mitocondrial (GOT2) de la aspartato aminotransferasa en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico de hipertermia e hipoxia. 55

Figura 22. Expresión del gen del arginina quinasa en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico de hipertermia e hipoxia. 56

Figura 23. Expresión de genes involucrados en el metabolismo anaerobio en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico de hipertermia e hipoxia. 57

Figura 24. Expresión de los genes HIF-1α y HIF-1β en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico de hipertermia e hipoxia. 58

Figura 25. Expresión de los genes que codifican las proteínas de choque térmico HSP70 y HSP90 en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico de hipertermia e hipoxia. 59

Figura 26. Porcentaje de cambio en expresión de los genes cuantificados en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico de hipertermia e hipoxia. 60

Figura 27. Red del metabolismo de carbohidratos (similar ciclo de Cori) entre diferentes tejidos de *L. vannamei* bajo estrés por hipoxia a corto plazo. 71

Lista de tablas

Tabla I. Tiempo letal medio (LR_{50}, nivel al que ocurre el 50% de la mortalidad) de PL de camarón blanco (*L. vannamei*) para diferentes temperaturas de exposición, a dos niveles de oxígeno disuelto, saturación (5 mgO_2/L) e hipoxia (2 mgO_2/L)……..34

Tabla II. Valor de estabilidad de los genes candidatos para ser utilizados como genes de referencia para validar el microarreglo de ADN heterólogo de branquias de juveniles de *L. vannamei* con *C. elegans* .....…….37

Tabla III. Genes seleccionados para validación del microarreglo heterólogo de branquias de juveniles de *L. vannamei* sometidos a los retos agudos de hipertermia (34 °C) y de hipoxia (2 mgO_2/L) …….37

Tabla IV. Genes seleccionados para validación del microarreglo heterólogo de branquias de juveniles de *L. vannamei* sometidos a un reto crónico de variaciones de temperatura (28 – 34 °C) y oxígeno disuelto (2 – 5 mgO_2/L) ……38

Tabla V. Oligonucleótidos cebadores de los genes seleccionados para validar el microarreglo heterólogo ARN de branquias de juveniles de *L. vannamei* con *C. elegans*, para los retos agudos ……39

Tabla VI. Oligonucleótidos cebadores de los genes seleccionados para validar el microarreglo heterólogo ARN de branquias de juveniles de *L. vannamei* con *C. elegans*, para los retos crónicos ……..40

Tabla VII. Oligonucleótidos cebadores de los genes de metabolismo anaerobio para validar el microarreglo heterólogo ARN de branquias de juveniles de *L. vannamei* con *C. elegans*, para los retos agudos y crónicos ……41

1. INTRODUCCIÓN

El camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) es la especie de crustáceo más importante para la acuicultura mundial, representando más del 50% de las 7.8 mil millones de toneladas de producción de crustáceos registradas en 2016 (FAO, 2018). En México, en el año 2017 esta especie se situó en el primer lugar de la producción acuícola nacional contribuyendo con más del 35% del total de la producción, con un volumen cercano a las 150 mil toneladas anuales y representando una fuente importante de ingresos y empleo para diversas comunidades costeras (SAGARPA, 2017).

Existen diferentes condiciones que afectan el rendimiento de los cultivos, tales como la incidencia y prevalencia de enfermedades por microorganismos patógenos entre las que destacan WSSV, IHHNV, AHPND, la insuficiencia de post-larvas de calidad, el alto costo del alimento y las variaciones en los parámetros fisicoquímicos del agua (FAO, 2018; MPEDA/NACA, 2003), entre los que resaltan la temperatura y el concentración de oxígeno disuelto por sus impactos en los organismos a nivel fisiológico, porque modifican el uso de reservas, el desempeño metabólico y la capacidad inmune, e incluso siendo causa potencial de mortalidad cuando se alcanzan valores extremos (Cheng*, et al.*, 2005; Seidman y Lawrence, 1985; Wayban *et al*., 1995; Zhang *et al*., 2006).

En cultivos extensivos y semi-extensivos, como los que se desarrollan en México, las variaciones en los parámetros fisicoquímicos dependen en buena medida de las condiciones ambientales. El comportamiento de la temperatura en los estanques, por ejemplo, presenta un fuerte componente diurno, por lo general incrementándose en el día debido a la exposición al Sol y disminuyendo durante la

noche. Por su parte, el oxígeno disuelto, típicamente presenta un incremento en la concentración durante el día, producto de la fotosíntesis en fitoplancton y macrófitas, mientras que por la noche disminuye debido a la respiración y falta de fotosíntesis, pudiendo llegar hasta niveles hipóxicos tanto en la columna de agua como en el fondo del estanque (Cheng *et al*., 2003).

Este comportamiento ocurre con claridad en nuestro País. De acuerdo con registros continuos realizados en estanques supra litorales de las cuatro entidades con mayor importancia en el cultivo de esta especie (Sonora, Sinaloa, Nayarit y B.C.S.; Fig. 1 Portillo y Magallón, coms pers), se observan las mayores bajas de oxígeno (2 mg/L) cerca del amanecer y variaciones de temperatura que van de 19 a 32 °C a lo largo del día, ocasionalmente alcanzando hasta los 34 °C. Estos valores se acercan a los límites de tolerancia del camarón blanco.

La temperatura es considerada un factor de primer orden porque determina el nivel de actividad (metabolismo) de los organismos (Hochachka y Somero, 2002). Por su parte, el OD, es un factor limitante para las especies acuáticas debido a que su disminución en el medio modifica las rutas metabólicas aerobias que son comúnmente utilizadas por los organismos (Wu, 2002). Por lo que, variaciones tanto en la temperatura como en la concentración de OD ocasionan cambios en el metabolismo de los camarones (Ulaje-Fernandez, 2015).

Por otro lado, el estrés se puede definir como un conjunto de respuestas fisiológicas de un organismo en reacción a un disturbio ambiental o metabólico para mantener su homeostasis (Schreck, 2000) y puede clasificarse temporalmente de acuerdo a su duración en: estrés agudo, cuando ocurre ante un evento súbito (minutos, horas, pocos días); y estrés crónico, producido ante

eventos ambientales de duración prolongada o recurrente (semanas) (Zacarías-Soto, 1997).

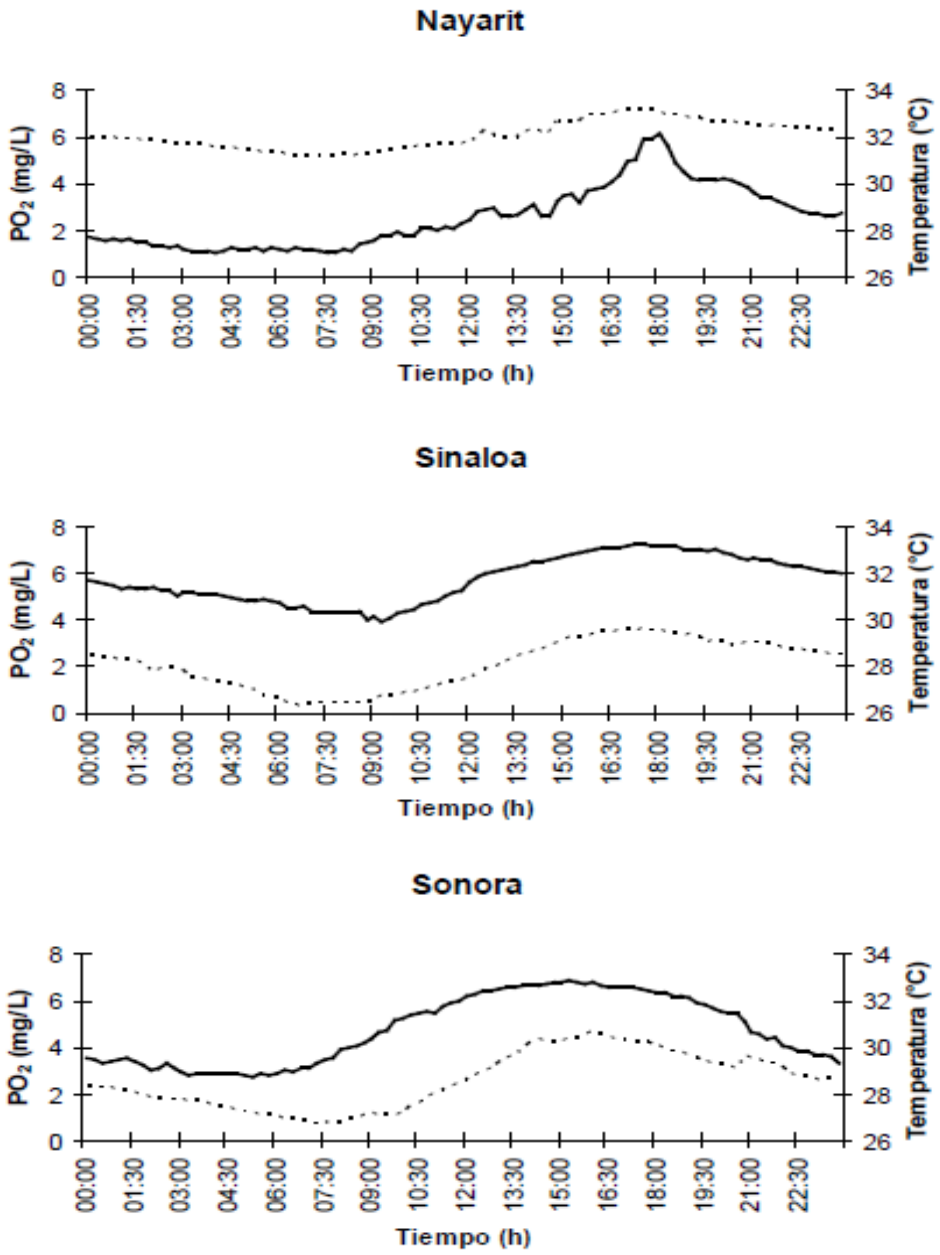

Figura 1. Patrones de variación diarios de oxígeno disuelto (línea solida) y temperatura (línea punteada), registrados en estanques de cultivo de camarón durante los periodos de mayor mortalidad, en Sinaloa, Sonora y Nayarit. (Cortesía de G. Portillo y F. Magallón).

Una de las respuestas adaptativas de los organismos ante eventos de estrés es la reorganización de los patrones de expresión de genes que les permitirán contrarrestar o minimizar el daño provocado. En la actualidad, existen diferentes herramientas que pueden usarse para evaluar la expresión génica bajo condiciones de estrés. Entre ellas la técnica de microarreglos resulta muy útil para evaluar la expresión génica de un organismo a través de la inmovilización de miles de sondas de genes para conocer los cambios en la expresión provocados por condiciones experimentales. Aunque en los microarreglos no es posible hacer una cuantificación exacta del nivel de incremento o supresión de la expresión, nos ofrece un amplio panorama para saber cuáles son las rutas metabólicas más afectadas, los genes involucrados y su importancia (Brown y Botstein, 1999; Ramírez, *et al*., 2003). Una vez obtenida esta información (expresión génica global), es posible hacer un análisis puntual de aquellos genes de interés mediante una técnica específica, como lo es la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR por sus siglas en inglés) y validar los resultados obtenidos en el microarreglo.

En el año 2011 en el proyecto de genómica de camarón (SAGARPA-CIBNOR No. 126427), en el subproyecto de ecofisiología, se analizaron las respuestas fisiológicas, contenido bioquímico y expresión génica de juveniles de *L. vannamei* ante exposiciones agudas y crónicas a hipertermia e hipoxia. De forma general para el contenido bioquímico, se observó que la principal respuesta es que las reservas de carbohidratos aumentan en músculo y branquias, mientras las de hepatopáncreas disminuyen; además, en músculo y hepatopáncreas se observa un aumento en las reservas de lípidos y disminución del contenido de proteínas. En cuanto a la expresión genética, para cada condición estresante se evaluaron las modificaciones provocadas en el transcriptoma (ARN) usando un microarreglo heterólogo con *Caenorhabditis elegans*, y los resultados mostraron que las principales rutas afectadas son las relacionadas con crecimiento y obtención de

energía, y que la expresión de los genes involucrados en dichas rutas depende del tipo y duración del estímulo. Llegando a la conclusión de que, las respuestas fisiológicas, de contenido bioquímico y de expresión génica observadas, están relacionadas a través del metabolismo energético.

En estudios recientes de expresión génica (microarreglos, macroarreglos, RNAseq), junto con análisis de qPCR, se ha identificado a conglomerados de genes responsables de la respuesta a estrés, así como nuevos genes específicos para de cada tipo de estrés en múltiples especies de camarones como *Palaemonetes pugio, Penaeus monodon* y *L. vannamei* (Gorr *et al*., 2010).

Por lo anterior, en la presente investigación se validaron los resultados obtenidos por microarreglo mediante un análisis cuantitativo (qPCR) de los genes asociados a rutas de obtención de energía, y basándonos en la información anterior responder las siguientes preguntas:

¿Cuáles son las respuestas en términos de reorganización en la expresión de genes de rutas metabólicas que utiliza *L. vannamei* para sobreponerse a condiciones de hipertermia e hipoxia?

¿La capacidad de los organismos para responder al estrés por temperatura se modifica, si esta condición ocurre después de afrontar un periodo de hipoxia y viceversa?

Cuando estas condiciones son recurrentes, ¿los organismos tendrán la capacidad de modificar a largo plazo su respuesta indicando mecanismos adaptativos?

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades del camarón blanco

Litopenaeus vannamei, conocido como camarón blanco, es originario de costa del Pacífico occidental de América Latina, desde México hasta Perú, donde las temperaturas del agua normalmente superan los 20°C durante todo el año. El éxito del cultivo de esta especie se debe en parte a que son organismos fácilmente domesticables, de alta supervivencia larval, tasas de crecimiento elevadas, menor requerimiento de proteína en la dieta y utilización eficiente de proteínas vegetales en dietas formuladas (Liao y Chien, 2011). Por otra parte, es una especie eurihalina que se ha llegado a cultivar experimentalmente en agua dulce (Scarpa y Vaughan, 1998), tiene una tolerancia aceptable al amoníaco y toxicidad por nitritos, por lo que es idónea para su producción en estanques de agua dulce tierra adentro o estanques supralitorales de agua marina (Liao y Chien, 2011). La termotolerancia del camarón blanco va de los 23 a los 30 ºC, siendo su crecimiento óptimo a los 28 ºC (Martínez-Córdova, 1999) y en relación al oxígeno disuelto, el desarrollo de *L. vannamei* ha sido determinado entre 3 y 5 mg/L (Lucien-Brun, 1989).

2.2. Estrés por hipertermia e hipoxia

El estrés promueve un conjunto de respuestas adaptativas que le permitirán al organismo mantener su homeostasis. Estas respuestas pueden llevarse a cabo en todos los niveles de organización, desde la regulación de la expresión génica hasta el comportamiento poblacional. En condiciones semi-controladas, como las de cultivo, los factores ambientales relacionados con la calidad de agua son una de las causas más comunes de estrés en organismos acuícolas; ya que, fluctuaciones en la temperatura (Cheng *et al*., 2005; Pascual *et al*., 2003), oxígeno

disuelto (Mugnier y Soyez, 2005; Mugnier *et al*., 2008; Pérez-Rostro *et al*., 2004), amonio (Mugnier *et al*., 2008; Racotta y Hernández-Herrera, 2000) y salinidad (Kumlu *et al*., 2010; Re *et al*., 2012) entre otras, pueden afectar el desempeño reproductivo, metabólico y/o inmunológico de organismos en cultivo.

La temperatura y oxígeno disuelto son dos de las variables ambientales de mayor relevancia para peneidos. En la naturaleza, los crustáceos al igual que los demás organismos, utilizan su capacidad de adaptación para persistir en el medio ambiente a través de ajustes de comportamiento, fisiológicos, metabólicos y moleculares; estos ajustes, son particularmente importantes porque les proporcionan la plasticidad fisiológica para hacer frente a fluctuaciones en la temperatura y oxígeno disuelto que experimentan en el medio donde se desarrollan (Re *et al*., 2012; Zhang *et al*., 2006).

La temperatura interviene en todos los niveles de organización biológica, desde las interacciones moleculares, hasta los patrones de distribución biogeográfica de los organismos (Somero, 1997). Es un factor que cambia la velocidad con que se realizan los procesos metabólicos, provocando respuestas fisiológicas con necesidades energéticas distintas, variaciones en la condición, el estado de salud y el crecimiento (Hochachka y Somero, 2002; Prosser, 1991; Schulte, 2015). A nivel molecular, afecta la capacidad de las proteínas para mantener una conformación funcionalmente correcta (Carreño-Mejía, 2009; Randall *et al*., 1997), la habilidad de las proteínas de choque térmico (HSP) para unirse efectivamente a los elementos reguladores de ADN (Somero, 1997; Spees *et al*., 2002) y la regulación de genes que codifican enzimas de reacciones metabólicas para obtener energía a partir de diferentes moléculas energéticas (Logan y Somero, 2010), entre los procesos más importantes. Lo anterior influye sobre el crecimiento, la supervivencia y los eventos reproductivos.

La concentración de oxígeno disuelto (OD) en el agua, es una variable ambiental limitante en las especies acuáticas, ya que el metabolismo aerobio es controlado por la disponibilidad de oxígeno en el medio. Al igual que la temperatura, disminuciones en la concentración de OD afectan a los organismos en todos los niveles de organización biológica, causando respuestas principalmente a nivel fisiológico, metabólico y molecular (Wu, 2002). A nivel ecológico, la concentración de oxígeno disuelto determina la productividad y biodiversidad de los océanos, debido a que no solo es esencial para la supervivencia de los organismos individuales, sino que además, regula los ciclos de los principales nutrientes y de carbono (Breitburg *et al*., 2018). A nivel fisiológico, interviene en la demanda de energía, provocando principalmente alteraciones en las tasas de respiración e ingestión (Rosas *et al.,* 1999; Ulaje-Fernández, 2015; Villarreal y Ocampo, 1993; Wu, 2002), a nivel de tejidos, principalmente provoca cambios en la concentración de carbohidratos y lípidos en músculo, hepatopáncreas y branquias (Pascual *et al*., 2003; Pérez-Rostro *et al*., 2004; Racotta *et al*., 2002; Sanchez *et al*., 2001; Ulaje-Fernández, 2015); y a nivel molecular, la hipoxia provoca que los organismos regulen el uso y suministro de energía para mantener su balance energético estable en bajas condiciones de recambio de ATP a través de modificaciones en el metabolismo de proteínas, ácidos grasos y carbohidratos; la síntesis de urea y el mantenimiento de gradientes electroquímicos (Na^+, K^+, Ca^{+2}) (Hochachka y Somero, 2002; Rathburn *et al*., 2013; Ulaje-Fernández, 2015).

2.3. Tolerancia térmica de *L. vannamei*

Comprender la tolerancia y la resistencia térmica mejora nuestra apreciación de las estrategias adaptativas que han desarrollado las especies a diferentes regímenes térmicos. En peneidos, la temperatura del agua afecta el rendimiento, incluidas las tasas metabólicas, de crecimiento e ingestión; fertilidad, comportamiento y también supervivencia (Herrera, *et al*., 1998). El camarón

blanco (*L. vannamei*), es una de las especies de peneidos más estudiadas; por lo cual, se conoce el efecto de la temperatura en la tasa de supervivencia y tolerancia de esta especie, mostrando que los valores obtenidos de la temperatura critica máxima (CTMax) varían de los 36 a los 42 °C dependiendo de la temperatura previa de aclimatación (Díaz *et al*., 2013; González *et al*., 2010; Kumlu *et al*., 2010; Re *et al*., 2012). A pesar de lo anterior, la obtención de la CTMax nos dice poco acerca de la resistencia de los organismos durante la exposición a altas temperaturas ya que es un indicador basado en cambios comportamentales de los organismos cuando pierden la capacidad coordinada de desplazamiento al elevar la temperatura a una velocidad constante o bajo un gradiente térmico sub-letal predefinido; en este sentido, usar el método de dosis letal media para temperatura (LT_{50}) es más preciso porque además arroja información que permite conocer el tiempo letal medio (LR_{50}) en el cual, una dosis de temperatura utilizada se vuelve letal para los organismos.

Por otro lado, la hipótesis de tolerancia térmica limitada por la capacidad y oxígeno (OCLTT, por sus siglas en inglés); se ha propuesto, para explicar las curvas de rendimiento térmico de organismos mediante la integración de mecanismos de la mayoría de los niveles de organización biológica en un contexto de evolución animal (Pörtner, 2001; Storch *et al*., 2014). Esta hipótesis, supone que bajo exposición a temperaturas más allá de los límites térmicos críticos (Tcrit), el metabolismo aeróbico ya no puede soportar la demanda de energía y los animales sucumben; sin embargo, la muerte puede posponerse por el uso del metabolismo anaeróbico compensatorio; proponiendo entonces, que la disponibilidad de oxígeno ambiental condiciona la tolerancia térmica de los organismos (Pörtner, 2001, 2002, 2010).

A pesar de conocer lo anterior, hasta ahora no existen estudios que busquen determinar el límite térmico superior (LT_{50}), cuando se combinan altas temperaturas con condiciones de hipoxia. Esta información, además de ser relevante a nivel ecológico, es particularmente importante para el cultivo de camarones porque permitirá reconocer a qué duración e intensidad la hipertermia combinada con hipoxia provoca mortalidades en los estanques.

2.4. Respuestas globales del organismo a hipertermia e hipoxia en crustáceos

En camarones peneidos, las respuestas fisiológicas se ven afectadas por la exposición a hipertermia e hipoxia. La tasa de ingestión aumenta cuando se incrementa la temperatura en el rango de 20 a 34 °C para camarones peneidos (Ponce-Palafox *et al*., 1997; Wyban *et al*., 1995), mientras que la exposición a hipoxia reduce la tasa de alimentación en una gran variedad de invertebrados marinos (cangrejos, ostras, langostas, medusas y camarón); siendo probable, que la reducción en el consumo de alimento sea la principal causa de la disminución de crecimiento durante periodos prolongados de hipoxia (Baden *et al*., 1990; Das y Stickle, 1993; Llansó y Díaz, 1994; Wu, 2002). En cuanto al consumo de oxígeno se ha observado en juveniles de *L. vannamei* y *Litopenaeus stylirostris*, una relación directa entre el aumento de consumo de oxígeno y el aumento de temperatura (20, 25, 30, y 35 °C), en altas salinidades (30, 35, 40 UPS) (Martínez-Palacios *et al.*, 1996; Spanopoulos-Hernández *et al*., 2005); además, se sabe que los peneidos son organismos oxirreguladores entre 4 y 5.8 mg/L de oxígeno disuelto (OD) y oxiconformadores entre 1 y 3 mg/L de OD, con niveles letales por debajo de 1 mg/L de OD (Rosas *et al.,* 1999; Villarreal y Ocampo, 1993). Para *L. vannamei* durante la oscilación crónica de OD y temperatura la tasa respiratoria sigue el mismo patrón de oscilación que ambas variables, observando aumento en el consumo de oxígeno en temperaturas y concentraciones de OD elevados, y

disminución en el caso contrario (Puente-Carreón, 2009; Ulaje-Fernández, 2015). En los camarones, la excreción de amonio se incrementa cuando la salinidad es alta y ante los cambios abruptos en la temperatura (Chen y Lin, 1995; Pillai y Diwan, 2002; Re *et al*. 2004). Rosas *et al*. (1999), reportan que la excreción del amonio en juveniles de camarón *L. setiferus*, disminuye en proporción directa con la baja concentración del oxígeno disuelto a salinidades de 15 y 35 UPS. En cuanto al estudio del balance energético en camarones penéidos; Rosas *et al*. (1998), observaron una disminución en la energía asimilada del alimento conforme disminuye el nivel de OD durante el crecimiento de postlarvas de *P. setiferus* y Ulaje-Fernández (2015), encontró que en la exposición crónica (24 días) a oscilaciones de oxígeno disuelto (2 a 5 mgO_2/L) y temperatura (28 a 34 °C); juveniles de *L. vannamei,* muestran una disminución en su potencial de crecimiento durante el periodo de exposición a hipertermia (34 °C, 5 mgO_2/L), en los días 14 y 24, esta respuesta es relacionada principalmente al aumento del metabolismo debido al estrés térmico.

2.5. Cambios en concentración de metabolitos en tejidos por efecto de hipertermia e hipoxia en crustáceos

El estrés provoca cambios metabólicos que tienen la finalidad de producir la energía necesaria para compensar el efecto del estrés y mantener su homeostasis; por lo cual, se han utilizado los cambios observados en proteínas, lípidos y carbohidratos en tejidos, para evaluar el efecto del estrés en camarones. Las proteínas totales disminuyen en hepatopáncreas y músculo debido al estrés por hipertermia en exposición tanto aguda como crónica (Ulaje-Fernández, 2015) y en condiciones de hipoxia, el contenido proteico aumenta en exposición aguda (1 h) (Pérez-Rostro *et al*., 2004), al contrario de la exposición a largo plazo donde disminuye (Ulaje-Fernández, 2015). En el caso de los carbohidratos se conoce que la glucosa en hemolinfa disminuye a causa de hipertermia crónica (Pascual *et*

al., 2003; Sanchez *et al*., 2001); y aumenta por hipoxia tanto aguda como crónica (Hall y van Ham, 1998; Racotta *et al*., 2002). Por otro lado, los carbohidratos totales aumentan en músculo y branquias; y disminuyen en hepatopáncreas por estrés por hipertermia e hipoxia en exposición tanto aguda como crónica (Pérez-Rostro *et al*., 2004; Ulaje-Fernández, 2015). Los lípidos aumentan en hepatopáncreas por exposición tanto aguda como crónica a hipertermia e hipoxia; observando cambios similares en músculo, excepto en exposición a hipertermia aguda donde no hay modificación en contenido de lípidos (Ulaje-Fernández, 2015). Para el caso particular de los triglicéridos, su contenido disminuye en hemolinfa y aumenta en hepatopáncreas por exposición a hipertermia (Pascual *et al*., 2003; Sánchez *et al*., 2001; Ulaje-Fernández, 2015). Además de lo anterior, en camarones peneidos se ha utilizado como una medida del metabolismo anaerobio la cuantificación de lactato y hemocianina en hemolinfa, observando que el lactato aumenta en exposición a hipoxia tanto a corto como a largo plazo (Mugnier *et al*., 2008; Racotta *et al*., 2002; Ulaje-Fernández, 2015); y disminuye en exposición crónica a hipertermia (Pascual *et al*., 2003); y en el caso de la hemocianina, su concentración aumenta en exposición a hipoxia tanto a corto como a largo plazo (Racotta *et al*., 2002; Ulaje-Fernández, 2015).

2.6. Cambios en la expresión génica

Debido a que el ambiente en la naturaleza es variable, los organismos han desarrollado mecanismos adaptativos que son utilizados para contrarrestar eventos de estrés y a nivel molecular, estos se ven reflejados en la expresión génica. Durante estos eventos, la transcripción modifica la expresión de genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y ácidos grasos, que permite a los organismos usar diferentes moléculas como sustrato metabólico y regular su consumo de energía. Se sabe que estas modificaciones pueden ser

generales o específicas para cada tejido, tipo y duración del estrés (Boutilier y Pierre, 2000; Wu, 2002).

2.6.1. Efecto de la hipertermia

En organismos acuáticos, el efecto de la temperatura en la expresión génica se relaciona principalmente con procesos de crecimiento, reparación celular y obtención de energía. Logan y Somero (2010), realizaron un estudio para analizar la respuesta de aclimatación a distintas temperaturas (9, 19 y 28 °C) en el pez *Gillichthys mirabilis,* observando que a temperaturas altas aumenta la expresión de genes relacionados con la biosíntesis y recambio de proteínas, y de transporte activo de membrana. En la trucha ártica (*Salvelinus alpinus*), se observó la sobreexpresión de genes relacionados con proteínas de choque térmico (HSP70, HSP90, HSP30), que actúan para la reparación del daño provocado por el incremento en la temperatura (Quinn *et al.*, 2011). De la Vega y colaboradores (2007), sometieron a organismos de camarón tigre (*Penaeus monodon)* a estrés por temperatura (35 °C), observando por medio de la técnica de microarreglos, la represión de genes de retro-transposones sin repetición terminal larga (LTR, por sus siglas en inglés). Ulaje-Fernández (2015), observó en *L. vannamei* bajo condiciones de hipertermia (34 °C) mediante el uso de un microarreglo heterólogo con *C. elegans,* un aumento en la expresión de genes relacionados con rutas de crecimiento y glucólisis y disminución en la expresión de genes de reparación celular, organización de membrana, organización de cromosomas y respuesta inmune.

Para *L. vannamei*, la mayoría de los trabajos relacionados con hipertermia se centran en la expresión de los genes codificantes para proteínas de choque térmico (HSP). Las proteínas de choque térmico (HSP) son una familia de proteínas producidas por las células en respuesta a la exposición a condiciones

estresantes y muchos miembros de este grupo realizan funciones de chaperona; es decir, estabilizan nuevas proteínas para asegurar el plegamiento correcto o ayudando a replegar las proteínas que fueron dañadas por el estrés celular. Muchas HSPs se expresan de forma constitutiva, representando del 5 al 10% de la proteína total en células normales y pueden aumentar dos o tres veces en células estresadas (Pokley *et al*., 2008; Sung *et al*., 2012). Las HSP70 son proteínas que desempeñan funciones esenciales en condiciones tanto normales como de estrés, incluido el plegamiento de proteínas *de novo*, la translocación en la membrana y la degradación de proteínas mal plegadas (Horváth et al., 2008). La proteína HSP90 es una chaperona molecular que se conserva de las bacterias a los humanos y su principal función es facilitar la maduración de sustratos incluyendo, quinasas, factores de transcripción, receptores de hormonas esteroides y ubiquitina ligasa E3, por lo que participa en otros procesos celulares además del plegamiento de proteínas, como son la reparación del ADN, el crecimiento y la respuesta inmune (Grad y Picard, 2007; Schopf *et al*., 2017; Wandinger, et al., 2008). La mayoría de la bibliografía para peneidos, se enfoca en la regulación de genes codificantes para HSP70 y HSP90 observando en la mayoría de los casos un aumento de expresión cuya intensidad varía dependiendo de la naturaleza e intensidad del estímulo, y el tejido analizado (De la Vega *et al*., 2006; Huang, *et al*., 2011; Selvakumar y Geraldine, 2005; Sornchuer *et al*., 2018).

2.6.2. Efecto de la hipoxia

Los crustáceos pueden tolerar bajas concentraciones de oxígeno disuelto, y tienen diversos mecanismos que son utilizados para lograrlo, entre ellos la expresión génica. La mayoría de los trabajos relacionan esta respuesta con la activación de genes involucrados en rutas de utilización y obtención de energía, y estrés oxidativo, algunos resultados muestran que la respuesta molecular a la hipoxia está mediada por el Factor Inducible por Hipoxia (HIF, por sus siglas en inglés), un heterodímero compuesto por dos subunidades (α y β), que regula la acción del

metabolismo anaeróbico activando o desactivando la transcripción de genes relacionados con la síntesis de transportadores de oxígeno, transportadores de glucosa y vías glucolíticas (Gorr *et al*., 2010; Schito y Rey, 2017; Semenza, 2012; Soñanez-Organis *et al*., 2009). En el camarón chino (*Fenneropenaeus chinensis)*, se encontró que la principal respuesta a la hipoxia es la activación de genes involucrados en las rutas de glucólisis y gluconeogénesis (Jiang*, et al.*, 2009). También se han observado cambios en genes del metabolismo de lípidos en *Palaemonetes pugio* en respuesta a hipoxia. Rathburn y colaboradores (2013), expusieron organismos de *L. vannamei* a hipoxia y observaron sub-expresión de genes involucrados en balance energético, biogénesis del ribosoma y síntesis de proteínas. Ulaje-Fernández (2015), observó en *L. vannamei* en respuesta a estrés por hipoxia aguda mediante el uso de un microarreglo heterólogo con *C. elegans,* la sobre-expresión de genes relacionados con crecimiento (constituyentes estructurales del ribosoma, metabolismo de nucleótidos) y procesos metabólicos (metabolismo de ácidos grasos insaturados, transporte mediante vesículas); en el caso de los genes sub-expresados, la respuesta está orientada hacia la modificación del metabolismo de aminoácidos y neurotransmisores, y disminuir el uso de oxígeno (actividad oxido-reductasa con donadores de oxígeno).

Específicamente para *L. vannamei*, se demostró la inducción de la expresión génica o el aumento de la actividad de enzimas del metabolismo de carbohidratos como característica durante condiciones de hipoxia. Los principales genes reportados son hexoquinasa (Soñanez-Organis *et al*., 2009), fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBP), fosfofructoquinasa (PFK) (Cota-Ruiz *et al*., 2015; Cota-Ruiz *et al*., 2016) y fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PEPCK) (Reyes-Ramos *et al*., 2018). PFK es una enzima clave reguladora de la glucólisis y la sobre-expresión observada apoya la hipótesis de la aceleración de la glucólisis como mecanismo compensatorio para obtener mayor energía de forma anaerobia durante esta condición estresante (Cota-Ruiz *et al*., 2015; Cota-Ruiz *et al*., 2016). Por otro lado,

la expresión del gen lactato deshidrogenasa (LDH) ha sido utilizado como indicador de la migración de glucólisis aeróbica hacia anaeróbica durante hipoxia; y además, se ha identificado que este gen generalmente se induce y es regulado a través de la acción del HIF-1 en *L. vannamei* (Soñanez-Organis *et al*., 2012). Además de lo anterior, recientemente se ha encontrado un incremento en la expresión del gen PEPCK en hepatopáncreas, donde probablemente el uso de la síntesis de glucosa en este tejido es realizado para exportar este carbohidrato vía hemolinfa a otros tejidos para mantener su demanda energética debido a el estrés provocado por la hipoxia (Reyes-Ramos *et al*., 2018).

En peneidos, la mayor parte de la información disponible sobre expresión de genes durante hipoxia solo está relacionada con la glucolisis anaerobia, generando un vacío de información sobre cómo la conexión entre glucólisis y ciclo de Krebs (metabolismo oxidativo) se ve afectada por la disminución en la disponibilidad de oxígeno. La citrato sintasa (CS), es una enzima que desempeña un papel central en varias rutas metabólicas; puesto que, al catalizar el primer paso del ciclo de Krebs, refleja la capacidad de entrada de acetil-CoA debido a la oxidación de ácidos grasos y carbohidratos; por lo tanto, cambios en la demanda aeróbica y ajustes mitocondriales pueden estar relacionados con la actividad de la CS (Marie *et al*., 2006; Pillet *et al.,* 2016; Strobel *et al.,* 2013). Otra enzima clave, es la succinato deshidrogenasa (también conocida como complejo II) ya que une dos vías principales en las mitocondrias: ciclo de Krebs y cadena respiratoria, siendo ambos esenciales para la fosforilación oxidativa. Particularmente la subunidad A (SDHA) está a cargo de la primera reacción y es de gran importancia para la respuesta a hipoxia, debido a que el succinato está involucrado en varias vías alternas, como formación de grupos hemo y el metabolismo de especies reactivas del oxígeno (Tretter *et al.,* 2016). A pesar de la importancia de estas dos enzimas del ciclo de Krebs, cambios en su expresión no han sido reportados aun, y solo existe información relacionada a actividad enzimática bajo condiciones de

hipoxia en el camarón *Pandalus borealis*, que demuestran aproximadamente un 40% de disminución en la actividad enzimática de CS muscular (Dupont-Prinet *et al*., 2013; Pillet *et al*., 2016).

Los crustáceos también utilizan la regulación de expresión de genes relacionados con HSPs en respuesta a hipoxia. El mecanismo principal por el cual las células responden al estrés por hipoxia es mediante una rápida modulación de la expresión del factor de transcripción HIF; respecto a esto, se ha propuesto para vertebrados que HIF puede regular la expresión de HSPs y se ha demostrado que la enzima Hsp90 está involucrada en la estabilización, expresión y transactivación de HIF bajo condiciones de hipoxia (Baird *et al*., 2006; Katschinski *et al*., 2004; Trisciuoglio *et al*., 2010), resaltando la importancia de la evaluación de la expresión tanto de HSPs como de HIF bajo condiciones de hipoxia. A pesar de lo mencionado, existen muy pocos estudios en crustáceos donde se haya evaluado la expresión de genes codificantes de HSPs durante condiciones de hipoxia, en *Fenneropenaeus chinensis* se observó la sobre-expresión del gen HSP90 a las 2 h de exposición a hipoxia; sin embargo, después de 8 h se observó el efecto contrario (sub-expresión) (Li *et al*., 2009). Para el gen HSP70, se encontró la sub-expresión en hepatopancreas para el camarón *Palaemonetes pugio* (Brouwer *et al*., 2007; Brown-Peterson *et al*., 2008) y para el cangrejo azul *Callinectes sapidus* (Brown-Peterson *et al*., 2005). En el caso específico de *L. vannamei,* solo existe un trabajo documentado en el cual se observa la sub-expresión del gen HSP60 en pleópodos después de 8 horas durante hipoxia, con recuperación a los valores normales dos días después de la exposición (Huang *et al*., 2011).

2.6.3. Efecto combinado de la hipertermia e hipoxia

Ulaje-Fernández (2015), observó que *L. vannamei* bajo exposición crónica (24 días) a variaciones de hipertermia (28 – 34 ^{o}C) e hipoxia (5 – 2 mgO_2/L), hace

modificaciones a nivel de expresión de genes relacionados con crecimiento y obtención de energía. Los periodos de hipertermia provocaron principalmente la sub-expresión de genes involucrados en las rutas de síntesis de proteínas y glucólisis; y sobre-expresión en genes de rutas relacionadas con metabolismo de aminoácidos (actividad endopeptidasa, biosíntesis de péptidos no ribosomales) y NAD (P) (dominio de unión NAD (P), actividad óxido-reductasa con NAD (P)). Bajo los periodos de hipoxia, se observó sub-expresión de genes relacionados con síntesis de proteínas (ribosoma) y glucólisis; y aumento de expresión de genes involucrados en los procesos de organización de membranas (focalización de proteínas hacia la membrana, organización interna de la membrana mitocondrial, importación de proteínas hacia el interior de la membrana mitocondrial).

3. JUSTIFICACIÓN

L. vannamei es un recurso valioso para México, ya que genera una importante cantidad de divisas a través de la camaronicultura. Sin embargo, se han reportado pérdidas significativas asociadas a las condiciones de cultivo y al clima de las entidades donde se ubican las granjas. Por ello, describir los mecanismos de respuesta de los camarones desde el punto de vista energético a través de los cambios de expresión en rutas metabólicas considerando las variaciones reales de hipertermia e hipoxia que presentan los estanques; es relevante, porque contribuirá con bases para proponer estrategias para un mejor manejo de los cultivos.

4. HIPOTESIS

En *L. vannamei* bajo condiciones de hipertermia, hipoxia o bajo el efecto de ambos factores, se observan respuestas fisiológicas, metabólicas y de expresión génica relacionadas con obtención de energía, como estrategia fisiológica adaptativa de la especie. Por lo tanto, si *L. vannamei* es expuesto a fluctuaciones de hipertermia e hipoxia, entonces, se observarán cambios en la expresión de genes de rutas del ciclo de Krebs y el metabolismo de carbohidratos (CHO), lípidos (LIP) y aminoácidos (AA) en el corto y largo plazo, relacionadas con los mecanismos que les proporcionan la plasticidad fisiológica para hacer frente al estrés provocado.

5. OBJETIVOS

5.1. General

- Describir el efecto de la hipertermia e hipoxia en la modificación de la expresión de genes del ciclo de Krebs y metabolismo de carbohidratos, lípidos y aminoácidos que ocurre en *L. vannamei*, e identificar si existen mecanismos asociados a cada factor (hipertermia vs hipoxia) y si estos varían con el tiempo de exposición (corto vs largo plazo).

5.2. Específicos

- Estimar la tolerancia térmica del camarón blanco bajo el estrés combinado de temperatura e hipoxia.

- Cuantificar la expresión de genes de las rutas metabólicas asociadas con la respuesta aguda a hipertermia e hipoxia.

- Cuantificar la expresión de genes de las rutas metabólicas asociadas con la respuesta a variaciones cíclicas de temperatura y oxígeno disuelto en el corto y largo plazo.

6. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo es continuidad de la tesis de maestría titulada: “Relación entre respuestas fisiológicas, contenido bioquímico y expresión del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) ante cambios agudos y crónicos de hipertermia e hipoxia”. En el cual, se encontró que fluctuaciones de hipertermia e hipoxia provocan cambios en tasas fisiológicas, uso y movilización de metabolitos en tejidos, y modificaciones en la expresión de genes relacionados con el crecimiento y metabolismo energético en los camarones, y que estos cambios en su conjunto forman una respuesta integral del organismo a nivel energético. A partir de estos resultados, en el presente trabajo se describe cuáles son los diferentes patrones de expresión de los genes que pertenecen a las rutas metabólicas encontrados anteriormente, y que pueden ser utilizados como estrategia para compensar el estrés provocado por la hipertermia y la hipoxia tanto en el corto como en el largo plazo.

6.1. Organismos experimentales

Post larvas (PL) (0.0636 ± 0.0015 g) y juveniles (10.6 ± 1.5 g) de *L. vannamei* se obtuvieron de una granja comercial en La Paz, B.C.S., México. Los camarones se transportaron al Laboratorio de Ecofisiología en CIBNOR, donde las PL se distribuyeron y aclimataron en tanques de 200 L y los juveniles en tanques de 800 L durante 2 semanas con agua de mar filtrada a 1 µm a 28 ± 0.2 ° C, salinidad de 40 mg/L, con aireación constante y 50% de recambio de agua diario. Durante el período de aclimatación, las PL se alimentaron *ad libitum* tres veces al día con alimento comercial micropartículado (Nutrimar Zeigler, 35% de proteínas, 7% de lípidos, 4% de fibra cruda), y los juveniles se alimentaron *ad libitum* dos veces al día con alimento comercial micropartículado (Nutrimentos Acuícolas Azteca, 35% de proteínas, 10% de lípidos, 3% de fibra cruda). El alimento no consumido y las

heces se extrajeron con sifón una vez al día en ambos casos. Antes de la exposición a la hipertermia y la hipoxia, los camarones juveniles se pesaron y se observaron los urópodos bajo un microscopio binocular para discernir la fase de muda, como lo describen Robertson *et al*. (1987). Todos los camarones muestreados se encontraban en la etapa de intermuda o premuda temprana.

6.2. Termotolerancia de PL de *L. vannamei* a hipertermia e hipoxia

Para determinar la sensibilidad de PL de *L. vannamei* a hipertermia e hipertermia combinada con hipoxia, se realizaron un total de 10 bioensayos de dosis-respuesta donde se evaluó el tiempo letal medio (LR_{50}) y la dosis letal de hipertermia (LD_{50}) a diferentes tiempos. Se utilizaron un total de 20 camarones seleccionados al azar para cada uno de los experimentos independientes, los cuales se mantuvieron en ayunas 12 h antes de la exposición y para reducir el estrés causado por el manejo, se incubaron individualmente en respirómetros de 70 ml 8 h antes de la exposición. El control de las variables para cada condición experimental se llevó a cabo en tanques de 300 L conectados a cada una de las cámaras individuales correspondientes, donde la temperatura experimental se mantuvo usando calentadores-enfriadores y el oxígeno disuelto usando aireación e inyección de nitrógeno gaseoso. Cada una de las cámaras se cerró con una tapa hermética y el flujo de agua marina filtrada a 1 µm se mantuvo a 50 mL/min durante 96 horas. Las variables se midieron en la entrada y salida del agua de las cámaras. Durante los experimentos, la temperatura se registró utilizando un sensor de temperatura (HOBO, Pendant Data Logger) y el oxígeno disuelto usando un minisensor de oxígeno de tipo aguja (Microx TX2, PreSens, Regensburg, Germany), calibrado a la temperatura experimental.

Para determinar LT_{50} y LR_{50} para temperatura, los organismos se expusieron repentinamente a 36, 38, 39 y 40 °C, manteniendo el oxígeno disuelto a saturación durante 96 h. Para determinar LT_{50} y LR_{50} para temperatura e hipoxia combinados, los organismos se expusieron repentinamente a 36, 38, 39 y 40 °C, con una concentración de oxígeno disuelto a 2 mg/L durante 96 h. Una vez que comenzó la exposición, ya no se alimentó a los organismos, los cuales se observaron y se registró la mortalidad a intervalos de una hora, hasta que se alcanzó la mortalidad total o las 96 horas del experimento. Los camarones que no mostraron movimiento corporal, de branquias y del corazón se consideraron muertos. LT_{50} y LR_{50} se estimaron según la observación de mortalidad para ocho tiempos de exposición diferentes: 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 y 96 h, mediante un análisis Probit con ajuste de Chi cuadrado, utilizando el siguiente modelo:

$$\ln [Y / (1-Y)] = a + bX \quad (1)$$

Donde X es la presión del factor (temperatura) e Y es la proporción de individuos muertos (Pallateri *et al*., 2018).

6.3. Bioensayo para determinar los cambios en expresión génica de *L. vannamei* ante condiciones de hipertermia e hipoxia

El diseño experimental para evaluar los cambios en la expresión génica, consistió en someter a los organismos juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) de 11 ± 0.5 g aclimatados en condiciones óptimas de temperatura (28 ºC) y oxígeno disuelto (5 mgO_2/L), a tres retos de estrés, un cambio abrupto de temperatura alta (34 ºC) con exposición durante 2 h (Fig. 2), un cambio abrupto de hipoxia (2 mgO_2/L) con exposición durante 2 h (Fig. 3); y cambios de temperatura y oxigeno pero con variaciones de forma cíclica por día para evaluar la respuesta crónica, simulando lo que ocurre en estanques bajo condiciones sub-óptimas de cultivo (Fig. 4). La amplitud de las fluctuaciones de la temperatura (± Δt °C) fue de ± 3 °C con promedio diario de 31 °C, y las fluctuaciones para la concentración de oxígeno

(± ΔDO mgO_2/L) fueron ± 1.5 mgO_2/L con un promedio diario de 3.5 mgO_2/L. Esta condición oscilante se mantuvo durante 24 días en tanques de 800 L y las fluctuaciones fueron similares a las condiciones en estanques de acuicultura de camarón, donde la hipertermia (34 °C, 5 mgO_2/L) se alcanzó a las 4 pm y la hipoxia (2 mgO_2/L, 28 °C) a las 4 de la mañana. Los tiempos de muestreo fueron los siguientes: grupo control (28 °C, 5 mgO_2/L) a las 0 h; durante la exposición a hipertermia (34 °C), y a hipoxia (2 mgO_2/L), a los 2, 5, 14 y 24 días. Durante este período, los camarones fueron alimentados dos veces al día al 5% de su biomasa con el alimento comercial mencionado anteriormente para juveniles.

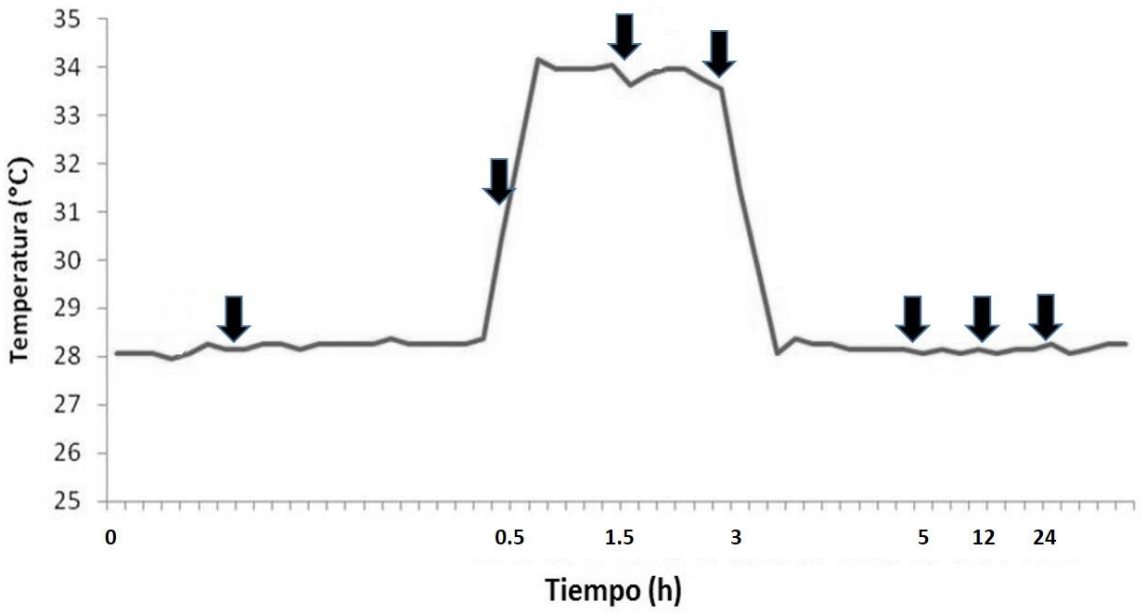

Figura 2. Registro de temperatura al que fueron expuestos juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) de 11 g de peso, durante el cambio agudo. Las flechas indican el tiempo y condición en que los muestreos fueron realizados.

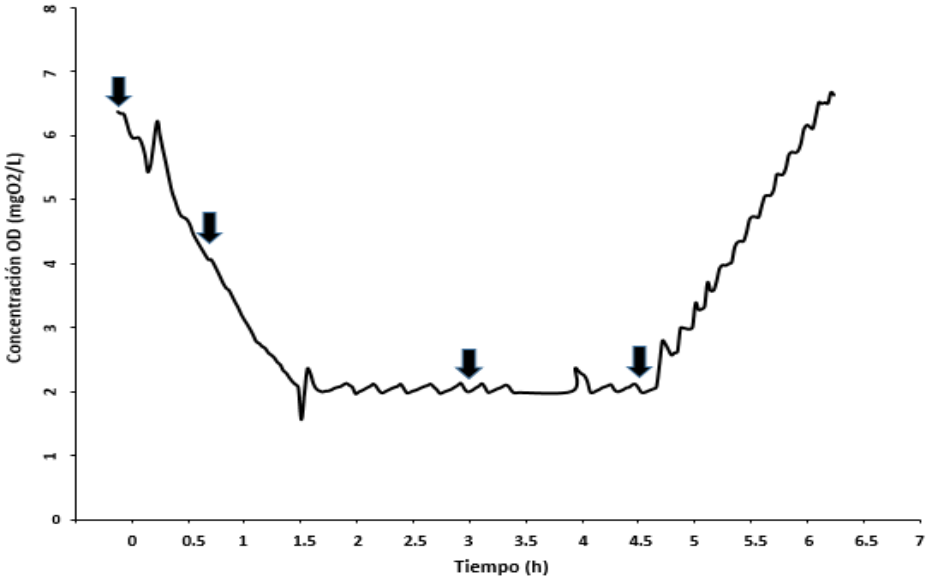

Figura 3. Registro de oxígeno disuelto al que fueron expuestos los juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) de 11 g de peso, durante el cambio agudo. Las flechas indican el tiempo y condición en que los muestreos fueron realizados.

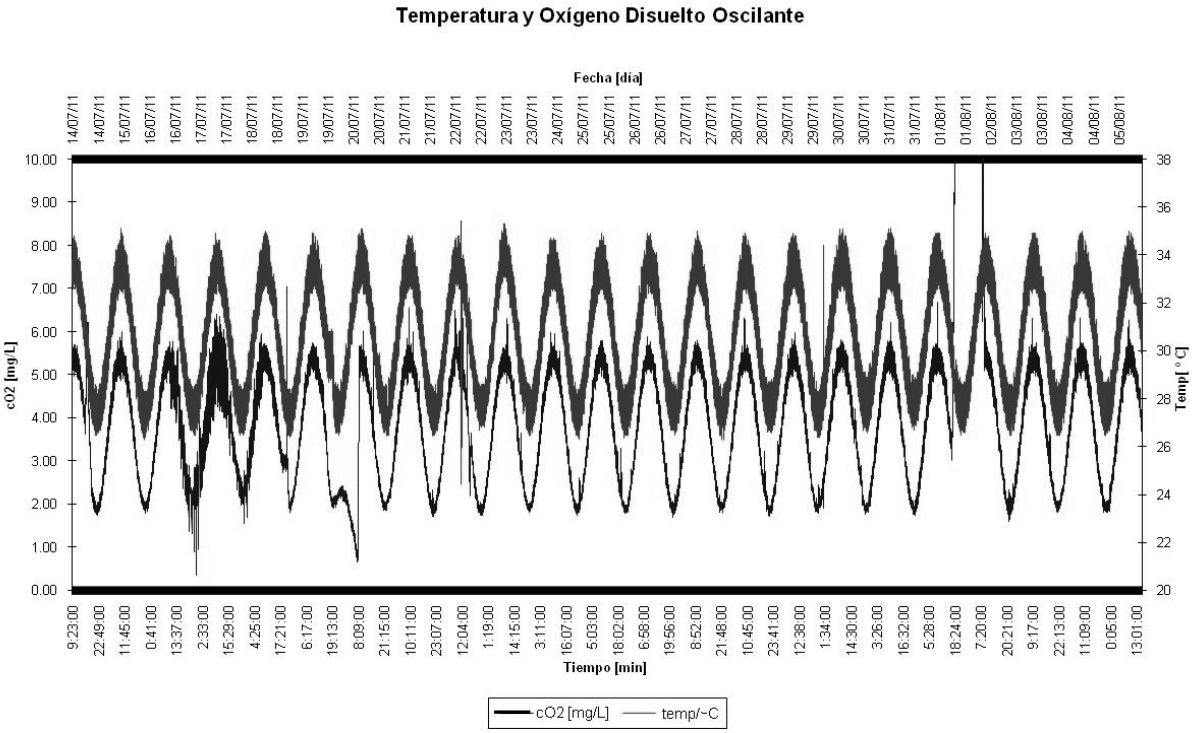

Figura 4. Registro de las oscilaciones térmicas (línea gruesa) y de oxígeno (línea delgada) disuelto a las que fueron expuestos organismos juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) de 11 g de peso, para evaluar la respuesta crónica a 28 días.

6.4. Análisis de la expresión génica

6.4.1. Genes de referencia

Se realizó una pre-selección de los genes de referencia tomando en cuenta aquellos genes del micorarreglo con Z-score entre 1 y -1; y además que se sabe no tienen una variación de expresión significativa en respuesta a hipertermia o hipoxia. Después, se examinó la estabilidad de expresión para cada gen en ADNc (1/10) con las diversas condiciones (retos agudos y crónicos de hipertermia e hipoxia); y los Ct promedio obtenidos fueron utilizados para calcular la estabilidad en la expresión de cada gen de referencia candidato usando los programas, geNorm, y NormFinder (Andersen *et al*., 2004; Vandesompele *et al*., 2002). El valor utilizado en geNorm fue una transformación de los valores de Ct en cantidades relativas (Q) con un nivel de expresión máximo de 1 (geNorm manual, 2008):

$$Q= E^{\Delta Ct} \qquad (2)$$

$$Q= E^{(minCt-sampleCt)} \qquad (2a)$$

Donde:

Q: cantidad de la muestra relativa a la muestra con mayor expresión.

E: eficiencia de amplificación (2=100%).

minCt: menor valor de Ct= valor de Ct de la muestra con mayor expresión.

NormFinder utiliza un modelo que analiza las varianzas en los datos de expresión lo cual permitió hacer una evaluación entre-grupos e intra-grupos (grupos = condiciones de este estudio, temperatura, OD, corto y largo plazo) más robusta en caso de genes co-expresados ya que se evalúa la estabilidad de cada gen

independientemente de otros genes. Para este análisis se usó el logaritmo natural de los Cq promedio por individuo o muestra (Andersen et al., 2004).

Se seleccionaron aquellos con la mejor eficiencia de amplificación para qPCR y que además se expresaron de manera constante en cada tratamiento; es decir, que no se observó sobre- o sub-expresión en las condiciones experimentales según los parámetros propuestos por Pfaffl (2001).

6.4.2. Selección de genes blanco

Se realizó una pre-selección de los genes blanco a partir del análisis de los datos obtenidos del microarreglo heterólogo de *L. vannamei* con *C. elegans,* mencionados en los antecedentes, utilizando los programas bioinformáticos Blast2GO (Conesa*, et al.*, 2005) y DAVID (Huang, *et al*., 2009); posteriormente, se obtuvieron los identificadores de aquellos genes que estuvieron relacionados con rutas metabólicas y fueron introducidos en el software en línea KEGG Mapper (http://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway2.html), con el cual se obtuvieron los mapas metabólicos de *C. elegans* con los genes sub y sobre-expresados para cada uno de los retos donde se observó modificación. Una vez obtenidos estos mapas, se utilizaron las bases de datos de UniProt (http://www.uniprot.org/) y NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/), para corroborar las características de cada gen (función, estructura, ubicación). Una vez realizado esto, se seleccionaron genes para evaluarlos por qRT-PCR a partir de los siguientes criterios:

- ✓ Especificidad por hipertermia o hipoxia.
- ✓ Relación directa con moléculas energéticas.
- ✓ Expresión diferencial en rutas metabólicas relacionadas con obtención, utilización o almacenamiento de energía.

- ✓ Relación con antecedentes de respuestas fisiológicas provocadas por hipertermia o hipoxia.

6.4.3. Genes del metabolismo anaerobio

Además de los obtenidos del microarreglo, se seleccionaron genes relacionados con la regulación del metabolismo anaerobio (HIF-1 y LDH), para observar si existe una relación entre estas respuestas. A partir de los genes reportados en la biblioteca informática internacional NCBI, se procedió con el diseño de los oligonucleótidos cebadores para cada gen y se evaluó la afinidad y eficiencia de amplificación en el PCR.

6.4.4. Diseño de oligonucleótidos para qPCR

Las secuencias de los genes seleccionados fueron obtenidas de NCBI, y aquellos que no fueron encontrados, se obtuvieron del transcriptoma de camarón generado por Ghaffari *et al*. (2014). En el caso de los genes obtenidos del transcriptoma de camarón, primero se realizó un alineamiento múltiple con secuencias homologas de cada gen en diferentes especies usando el programa en línea Clustal Omega (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) y la herramienta BLAST de NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), para identificar las regiones conservadas y probables inserciones en el gen. Luego se dedujo la secuencia de aminoácidos para cada uno de los genes con la herramienta en línea ExPASy translate (http://web.expasy.org/translate/) a las cuales también se les realizó un alineamiento con Clustal Omega y BLAST para definir la similitud con proteínas de otras especies. Una vez que se determinó con certeza la identidad de las secuencias de cada uno de los genes seleccionados, se realizó el diseño de oligonucleótidos.

Para los análisis por qPCR, se diseñaron cebadores específicos para cada gen. Los características requeridas para cada uno de los cebadores fueron: una longitud del producto de amplificación de 170 a 200 pb, contenido Guanina-Citosina (GC) entre el 50 y 60 %, evitar la formación de estructuras secundarias (homo y hetero dímeros, horquillas), Tm (temperatura de hibridación) entre 55 y 65°C, evitar más de 3 repeticiones de nucleótidos tanto de uno solo (ej. TTTT), como de pares (ej. TATATATA); y en la terminación 3´ evitar más de 3 G o C. Para calcular la Tm, contenido GC, el tamaño de los fragmentos y evitar repeticiones se usó el programa en línea Primer3plus (Untergasser, *et al*., 2012). Para corroborar virtualmente la ausencia de formación de estructuras secundarias se utilizó el programa en línea Oligo Analyzer v.3.1 de Integrated DNA Tecnologies, Inc. (http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/) y los diferentes cebadores obtenidos fueron evaluados por PCR punto final para establecer su especificidad. Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% (75-80 volts; 90 A; 30-45 min), teñido con GelRed (Biotium) utilizando un marcador de tamaños de 100 a 1500 pb junto con los productos de PCR para identificar el fragmento por su tamaño al ser visualizados en un transiluminador con luz UV (BioRad). Una vez corroborados los fragmentos por tamaño, se purificaron los productos de PCR para cada gen con el kit illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, UK), siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante; una vez purificados los productos de PCR de cada gen, se realizó una secuenciación tipo Sanger en la empresa Macrogen para comprobar que los fragmentos tuvieran las secuencias de nucleótidos esperadas para cada gen (Bustin *et al*., 2009).

6.4.5. Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó a partir de 100 mg de tejido de branquias en 1 mL de TriPure Isolation Reagent (Roche Applied Science). La homogenización se

realizó usando un pistilo en tubos de 1.5 mL. El ARN se resuspendió en agua libre de nucleasas (el volumen depende del tamaño del pellet ya sea 15, 30 o 50 µL) y se cuantificó la concentración obtenida en cada extracción utilizando un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific). La calidad del ARN se evaluó en electroforesis en gel de agarosa al 1% bajo condiciones desnaturalizantes (75-80 volts; 90 A; 30-45 min).

6.4.6. Tratamiento con ADNasa y obtención de ADNc

De la solución de ARN total se tomaron 4 µg para ser tratados con DNAsa I (AMPD1-DNase I, Sigma Aldrich) para eliminar contaminación por ADN genómico (ADNg). Para corroborar que el tratamiento con DNAsa es el adecuado, se realizó PCR punto final utilizando cebadores del gen UBIQ con las muestras de ARN tratadas con DNAsa, utilizando ADNc de branquias como control positivo (Bustin, et al., 2009); la amplificación (o falta de) fue corroborada por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%. Una vez confirmada la pureza del ARN se realizó la transcripción reversa del mismo a ADN complementario (ADNc). La síntesis de ADNc se llevó a cabo utilizando 2 µg/µL de ARN tratado con ADNasa en el caso de los retos agudos y 1 µg/µL de ARN de cada organismo para la expossicion crónica, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante del kit GoScript Reverse Transcription System (Promega).

6.4.7. Estandarización de la eficiencia de amplificación por qPCR

Diferencias en la eficiencia de amplificación entre genes blanco y de referencia pueden llevar a errores en la cuantificación relativa (Dieffenbach y Dveksler, 2003). Debido a lo anterior es necesario determinar la eficiencia de amplificación para cada par de cebadores que amplifican los genes blanco y de referencia. La eficiencia del qPCR se determinó de acuerdo a Pfaffl (2001) para cada par de

oligonucleótidos-cebadores de los diferentes genes a evaluar; realizando una curva estándar para cada gen de referencia y de interés (genes blanco).

6.4.8. Cuantificación de expresión génica por qPCR

La amplificación se realizó por triplicado con una dilución 1:20 utilizando el ADNc del tejido de branquia de cinco organismos para cada punto de muestreo por tratamiento (n=5) y 10 organismos en el caso del control (n=10, tiempo 0). Los análisis se realizaron en el termociclador de tiempo real StepOne System (Applied Biosystems | Thermo Fisher Scientific). Se utilizó como intercalante fluorescente iQ Syber®Green Supermix (BioRad), con las concentraciones de reacción especificadas por el fabricante para una reacción en 10µl de volumen final. Las condiciones de amplificación dependieron de las características de los genes a evaluar y una reacción con H_2O en lugar de templado fungió como control negativo. La expresión relativa se estimó a partir del Ct promedio de las muestras de cada punto de muestreo para cada gen objetivo, normalizando con el valor promedio de Ct del gen de referencia, mediante la fórmula:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (3)$$

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-(\Delta Ct\ \text{muestra} - \Delta Ct\ \text{control})} \quad (3a)$$

Donde:

$\Delta Ct\ \text{muestra} = (Ct_{,\text{blanco}} - Ct_{,\text{referencia}})_{\text{Tiempo } x}$

$\Delta Ct\ \text{control} = (Ct_{,\text{blanco}} - Ct_{,\text{referencia}})_{\text{Tiempo } 0}$

La expresión relativa se expresa en unidades adimensionales en función a la abundancia del ARNm del gen de referencia. En todos los casos los organismos muestreados en el tiempo 0 (28 °C, 5 mgO_2/L) fueron tomados como único control absoluto, por no haber presentado antes ninguna perturbación similar al estrés que se buscaba evaluar (Bustin *et al*., 2009; Livak y Schmittgen, 2001; Schmittgen & Livak, 2008).

6.4.9. Análisis de expresión génica global

Además de lo anterior, para el reto crónico se decidió analizar los resultados tomando la expresión de todos los genes analizados como una respuesta global de expresión génica, para saber si era posible observar diferentes patrones de expresión de los genes en relación con el tiempo de exposición. Para llevar esto a cabo, se realizó el conteo de los genes sobre- y sub-expresados y aquellos que no tuvieron cambios en la expresión para cada uno de los tiempos de muestreo y los valores obtenidos fueron graficados en relación al porcentaje que representaban con respecto al total de los genes cuantificados.

6.5 Análisis Estadísticos

A los valores obtenidos se les realizó un análisis de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de Cochran para corroborar la distribución normal y homogeneidad de varianzas de los datos. Los valores de LD_{50} fueron obtenidos mediante un análisis Probit y las diferencias se evaluaron utilizando la prueba de Chi cuadrada. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias obtenidas en expresión génica relativa por efecto de las variables ambientales (temperatura y oxígeno); en todos los casos, los organismos bajo condiciones óptimas (28 °C, 5 mgO_2/L) a las 0 h se consideraron como grupo control. Para aquellos tratamientos donde se presentaron diferencias significativas, se utilizó la prueba *a posteriori* de Fisher. Debido a la relación existente entre este trabajo y los resultados obtenidos en el trabajo de maestría para el reto agudo de hipoxia, se decidió realizar una integración de los resultados mediante un análisis factorial por el método de componentes principales con rotación varimax, usando factores ortogonales con eigenvalores > 2 como punto de corte para el análisis. Los análisis estadísticos para determinación de la termotolerancia fueron realizados con el programa Minitab v17 y los de expresión génica con el software STATISTICA v7. Se usó una significancia estadística de $p<0.05$ para todos los análisis.

7. RESULTADOS

7.1. Termotolerancia de PL de *L. vannamei* a hipertermia e hipoxia

La Fig. 5 muestra la temperatura letal media (LT_{50}) estimada para diferentes tiempos de exposición, a saturación de oxígeno (5 mgO_2/ L) (línea continua) y bajo hipoxia (2 mgO_2/ L) (línea punteada). Por otra parte, la tabla I muestra el tiempo letal medio (LR_{50}) para *L. vannamei* bajo cinco temperaturas. En las primeras 72 h, el valor obtenido de LT_{50} para evaluar el efecto de la hipertermia en la sobrevivencia de los organismos, es mayor aproximadamente 0.5 °C comparado con el efecto combinado de la hipertermia e hipoxia. Después de 72 horas, no se observaron diferencias significativas entre el estrés térmico y el efecto combinado de hipertermia e hipoxia. Para LR_{50}, existe una clara diferencia en la resistencia de *L. vannamei* entre la hipertermia y las condiciones combinadas a 38 y 39 °C, pero no se observaron diferencias a 28, 36 y 40 °C (Tabla I).

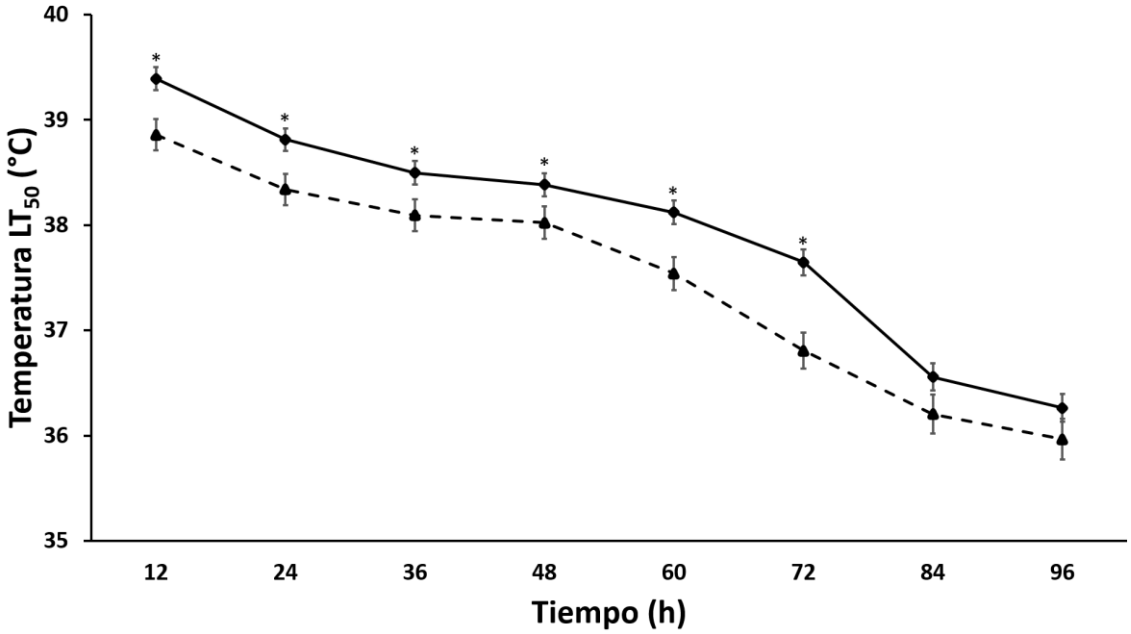

Figura 5. Temperatura letal media (LT_{50}, nivel al que ocurre el 50% de la mortalidad) de PL de camarón blanco (*L. vannamei*) para diferentes tiempos de exposición. Línea solida representa los valores obtenidos solo para exposición a temperatura manteniendo el oxígeno a saturación y la línea punteada representa la exposición simultánea de temperatura con hipoxia (2 mgO_2/L). Los asteriscos indican diferencias significativas.

Tabla I. Tiempo letal medio (LR_{50}, nivel al que ocurre el 50% de la mortalidad) de PL de camarón blanco (*L. vannamei*) para diferentes temperaturas de exposición, a dos niveles de oxígeno disuelto, saturación (5 mgO_2/L) e hipoxia (2 mgO_2/L).

	Tiempo letal medio				
	28 °C	36 °C	38 °C	39 °C	40 °C
Saturación	>96	>96	*66.9±0.9	*19.0±1.0	<1
Hipoxia	>96	>96	49.7±1.7	3.5±1.2	<1

Tiempo letal medio en horas (Media ± Error estándar). * Diferencias significativas con respecto a la exposición simultánea a hipertermia e hipoxia (P<0.0).

7.2. Selección de genes para análisis por qPCR

7.2.1. Genes de referencia

La Tabla II muestra los valores de estabilidad de expresión de los genes candidatos seleccionados para ser utilizados como genes de referencia. Se seleccionaron como candidatos los genes ubiquitina, S24, factor de elongación, 18S-1, 18S-2, RPL8 y S12, para su evaluación como genes de referencia debido a que no presentaron anteriormente sobre o sub-expresión en los análisis realizados para el microarreglo, además de ser genes considerados constitutivos para la especie. Los resultados del análisis por geNorm, y NormFinder arrojaron que los mejores valores de estabilidad de expresión los presentaron los genes ubiquitina (UBIQ) y RPL8 (L8), los cuales fueron seleccionados como genes de referencia.

7.2.2. Retos Agudos

Se realizó la selección de los genes de acuerdo a su importancia y especificidad por hipertermia o hipoxia, obteniendo 4 rutas metabólicas con dos genes seleccionados en cada una de ellas como lo muestra la Tabla III. La función de cada uno de los genes seleccionados es la siguiente:

- PFK: Fosforilación de la fructosa-6-fosfato a la 1,6-bisfosfato con gasto de un ATP. Reacción con función reguladora dentro de la glucólisis.

- TPI: Es una enzima que cataliza la interconversión entre gliceraldehído-3-fosfato (GADP) y dihidroxiacetona fosfato (DHAP).
- CS: Cataliza la reacción de condensación del acetato (proveniente del acetil-CoA) y del oxaloacetato para formar citrato.
- SDHA: Subunidad que cataliza la reacción de formación de fumarato a partir de succinato. Usa como cofactor una molécula de FAD. (También contiene el sitio de unión del succinato).
- ACS4: Cataliza la reacción de activación del ácido graso ARA por coenzima A formando un Acil-CoA, para su degradación. Consume dos enlaces de alta energía del ATP.
- CPT1: Cataliza la transferencia del grupo acilo (ácido graso) de la Acil-CoA a carnitina para formar palmitoil-carnitina, gracias a este paso los ácidos grasos pueden ser degradados en la mitocondria. Reacción limitante en la degradación de ácidos grasos.
- RPB4: Es la cuarta subunidad de la ARN polimerasa. Probable papel protector contra estrés.
- XDH: Los tres sustratos de esta enzima son xantina, NAD+ y agua; mientras que sus tres productos son urato, NADH y un ion hidrógeno. Participa en la regeneración de NADH.

7.2.3. Reto crónico

Se realizó la selección de los genes de acuerdo a su importancia y especificidad por hipertermia o hipoxia, obteniendo 8 genes de 4 rutas metabólicas como lo muestra la Tabla IV. La función de cada uno de los genes es la siguiente:

- Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa mitocondrial (PEPCKm): participa en la gluconeogénesis, donde cataliza la reacción irreversible de conversión del oxaloacetato en fosfoenolpiruvato y CO_2 consumiendo GTP.

- ATP-citrato liasa (ATP-CL): enzima ubicada en el citosol, que cataliza la reacción de degradación de citrato para regenerar acetil-CoA y oxaloacetato. Consume una molécula de ATP.
- Propionil Co-A Carboxilasa Subunidad B (PCCB): subunidad B de la enzima que cataliza la reacción de carboxilación del propionil-CoA, produciendo D-metilmalonil-CoA, compuesto que al ser convertido en succinil-CoA, entra en el ciclo de Krebs. Consume una molécula de ATP.
- Succinil-CoA: 3-cetoacido Co-A transferasa (SCOT): cataliza el paso limitante en la degradación de cuerpos cetónicos, transfiriendo el CoA de succinil-CoA a acetoacetil CoA. El acetoacetil-CoA puede ser convertido en acetil-CoA, para entrar en el ciclo de Krebs.
- Fumaryl Acetoacetato Hidrolasa (FAH): participa en la degradación de aminoácidos, es la última enzima en la sub-ruta que sintetiza acetoacetato y fumarato desde L-fenilalanina.
- Arginina quinasa (AK): cataliza la reacción de degradación de arginina fosfato para regenerar ATP a partir de ADP.
- Aspartato aminotransferasa (GOT 1-2): enzima que puede encontrarse en el citosol (GOT1) y mitocondria (GOT2), cataliza la reacción de transferencia de un grupo amino de L-aspartato al 2-oxoglutarato, formándose L-glutamato y oxaloacetato. También puede actuar sobre la L-tirosina, la L-fenilalanina y el L-triptófano. Es parte fundamental de lanzadera de electrones malato-aspartato.

Tabla II. Valor de estabilidad de los genes candidatos para ser utilizados como referencia para validar el microarreglo heterólogo de branquias de juveniles de *L. vannamei* con *C. elegans*.

Nombre del Gen	Valor de estabilidad
UBIQ*	0.0061
RPL8*	0.0061
S24	0.0062
S12	0.0073
FE	0.0082
18S-2	0.0104
18S-1	0.0112

*Genes seleccionados para los análisis de expresión

Tabla III. Genes seleccionados para validación del microarreglo heterólogo de branquias de juveniles de *L. vannamei* sometidos a un reto agudo de hipertermia (34°C) y un reto agudo de hipoxia (2 mgO_2/L). La hibridación se realizó con genes de *C. elegans*.

RUTA	GENES	HIPERTERMIA		HIPOXIA	
		Sobre-expresados	Sub-expresados	Sobre-expresados	Sub-expresados
Glucólisis	PFK	-	-	X	-
	TPI	X	-	-	-
Ciclo Krebs	CS	-	-	X	-
	SDHA	X	-	-	-
Metabolismo ácidos grasos	ACS4	-	X	X	-
	CPT1	-	-	X	-
Metabolismo nucleótidos	RPB4	-	X	X	-
	XDH	X	-	-	-

Tabla IV. Genes seleccionados para validación del microarreglo heterólogo de branquias de juveniles de *L. vannamei* sometidos a un reto crónico de variaciones de temperatura (28 – 34 °C) y oxígeno disuelto (2 – 5 mgO_2/L).

RUTA	GENES	HIPERTERMIA		HIPOXIA	
		Sobre-expresión	Sub-expresión	Sobre-expresión	Sub-expresión
Gluconeogénesis	PEPCK	X	-	-	-
Ciclo Krebs	ATPCL	X	-	-	-
Metabolismo de fosfágenos	AK	-	-	X	-
Metabolismo aminoácidos	PCCB	-	X	-	-
	SCOT	-	-	X	-
	FAH	-	-	X	-
	GOT1	X	-	-	-
	GOT2	-	X	-	X

7.3. Diseño de oligonucleótidos cebadores

7.3.1. Genes de rutas metabólicas

A partir de los alineamientos múltiples para los nucleótidos se procedió con el diseño de los oligonucleótidos cebadores para cada gen y se evaluó la afinidad y eficiencia de amplificación en el PCR. La información de cada juego de cebadores utilizados se muestra en la Tabla V y VI. Además de lo anterior, se analizaron los resultados obtenidos de la secuenciación tipo Sanger y su alineamiento con la secuencia de interés, donde se observó que la secuencia de los productos obtenidos es idéntica a los fragmentos que se buscó amplificar.

Tabla V. Oligonucleótidos cebadores de los genes seleccionados para validar el microarreglo heterólogo ARN de branquias de juveniles de *L. vannamei* con *C. elegans*, para los retos agudos.

GEN	Secuencia (5´- 3´) FORWARD	Secuencia (5´- 3´) REVERSE	Tamaño del producto	Eficiencia	Temperatura alineamiento
PFK	TGTTGCTGCTTTGACCTCTG	TTCTTCACTCCTTCCGCTGT	198	91.9	60
TPI	TCCTCCCCAACATCTCTGAC	GCACTGACAGAGCCACCATA	188	92.2	60
ACS4	CAGACAAACCAAGACCACGA	CCAAGTCCTTCTTTCGGTCA	185	92.9	60
CPT1	GGCATACTTCAGGGATGCTG	TCTGGTGTTGACCACATGCT	197	93.7	60
CS	CAACCTGGCCTGACTTGAGG	TGACCCCTACCTCTCCTTCG	177	90.6	60
SDHA	GCTGTGTTCCGTACTGGTGA	CAGGGGCTTGCTGTAGTCAT	182	92.7	60
RPB4	GCCACGATTAAGGCCATTCG	TGTTGCCATGTCCTCTAGCA	190	96.7	60
XDH	GCCTCGGACTCTTCACCCTA	CAGCCTTGGACGAGAAGACA	171	91.5	60
UBIQ	GGGAAGACCATCACCCTTG	TCAGACAGAGTGCGACCATC	146	93.5	57
L8	GCCTAAGGTGCGTGGTGT	ATTCTGCCTTGGGTCCTTCT	181	94.7	57

Tabla VI. Oligonucleótidos cebadores de los genes seleccionados para validar el microarreglo heterólogo ARN de branquias de juveniles de *L. vannamei* con *C. elegans*, para los retos crónicos.

GEN	Secuencia (5´- 3´) FORWARD	Secuencia (5´- 3´) REVERSE	Tamaño del producto	Eficiencia	Temperatura alineamiento
PEPCK	AACTCCCTCTTCTGCACACC	CCTCAGATCTCATGGCTCCT	177	91.9	60
ATPCL	ACAAAGGAGAACCACCCTGA	ATGCGCAGACCCTCTTGATA	182	92.2	60
SCOT	GGGAAAGAGACCGTGACTGTC	TGACACCAGGTCCATTGCAC	189	92.9	60
PCCB	GAATGAATGGCCGCACAGTTG	TGGCGGATGATACCACCGTA	187	93.7	60
FAH	GACCCTGAACCCTTCCCTTA	ATAAGATCTCCGGGCCTGAC	175	90.6	60
AK	ATCACCTCCGCATCATCTCC	AAGCTTGGGCAGCTTGATGT	195	92.7	60
GOT1	CCAGATCACACTGCTTGTCC	GTTCCAGGTTCCTGGTGTTC	200	96.7	60
GOT2	TGTATGGTGAGAGAGCTGGTG	ATGCCCTTGACATCCTTCAG	195	91.5	60
HSP70	CTCCTGCGTGGGTGTGTT	GCGGCGTCACCAATCAGA	194	83.5	57
HSP90	TGGGCTTCTACTCCGCCTACC	ACGGTGAAAGAGCCTCCAGCA	185	89.1	55

7.3.2. Metabolismo anaerobio

La información de cada juego de cebadores utilizados relacionados con la regulación del metabolismo anaerobio se muestra en la Tabla VII. Además de lo anterior, al igual que con los genes de las rutas metabólicas anteriores, se realizó una secuenciación tipo Sanger, y se analizaron los resultados obtenidos con el alineamiento con la secuencia de interés, donde se observó que la secuencia obtenida de los productos de PCR es idéntica a los fragmentos que se buscó amplificar.

Tabla VII. Oligonucleótidos cebadores de los genes de metabolismo anaerobio para validar el microarreglo heterólogo ARN de branquias de juveniles de *L. vannamei* con *C. elegans*, para los retos agudos y crónicos.

GEN	Secuencia (5´- 3´) FORWARD	Secuencia (5´- 3´) REVERSE	Tamaño del Producto	Eficiencia	Temperatura alineamiento
HIF-1α	GACTTGACCCACTTGGCTCC	CCTGCTGCTAAGACGCTTC	219	92.5	63
HIF-1β	CAAGAGCCAGCCAACCAAG	CTGCGTCAGAGAAATTCC	189	90.6	63
LDH1	GTCGCCTCTCTGGTGCAT	CATTGTTGCATCACGCGCCTTA	252	92.05	63
LDH2	GTGCTGTTCTAACCAGGG	CATTGTTGCATCACGCGCCTTA	255	91.4	63

7.4. Análisis de expresión génica de retos agudos

7.4.1. Metabolismo de carbohidratos

El nivel de expresión relativa de los genes de fosfofructocinasa (PFK) y triosa fosfato isomerasa (TPI) en el tejido de branquias de juveniles de camarón blanco expuestos a los retos agudos de hipertermia e hipoxia se muestran en las Figs. 6 y 7. Para el reto agudo de hipertermia, aunque se observó una tendencia a aumentar el nivel de expresión de PFK, no se observaron cambios significativos con respecto al control. Por otro lado, en el caso de la exposición a hipoxia aguda, se observó una clara tendencia a incrementar la expresión del gen PFK conforme pasa el tiempo de exposición observando diferencias significativas a las 3 h y 12 h siendo estos los puntos de mayor expresión. En el caso del gen TPI, durante el reto de temperatura se observó incremento significativo de la expresión a las 24 h. En el reto de hipoxia, no se encontraron diferencias significativas en ningún punto de muestreo.

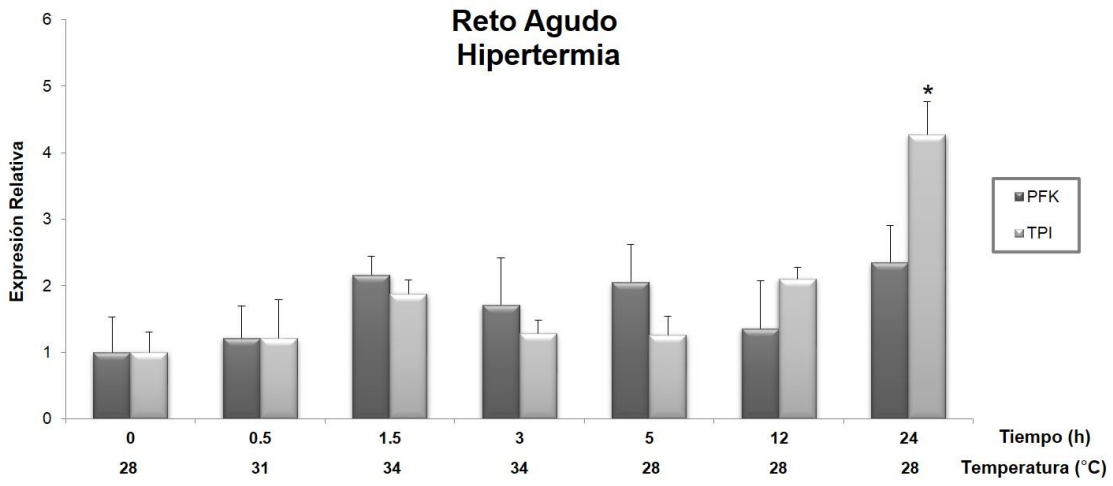

Figura 6. Expresión de genes del metabolismo de carbohidratos en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. La expresión relativa se expresa en función de los genes de referencia L8 y ubiquitina. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=5). PFK= Fosofofructocinasa TPI= Triosa fosfato isomerasa

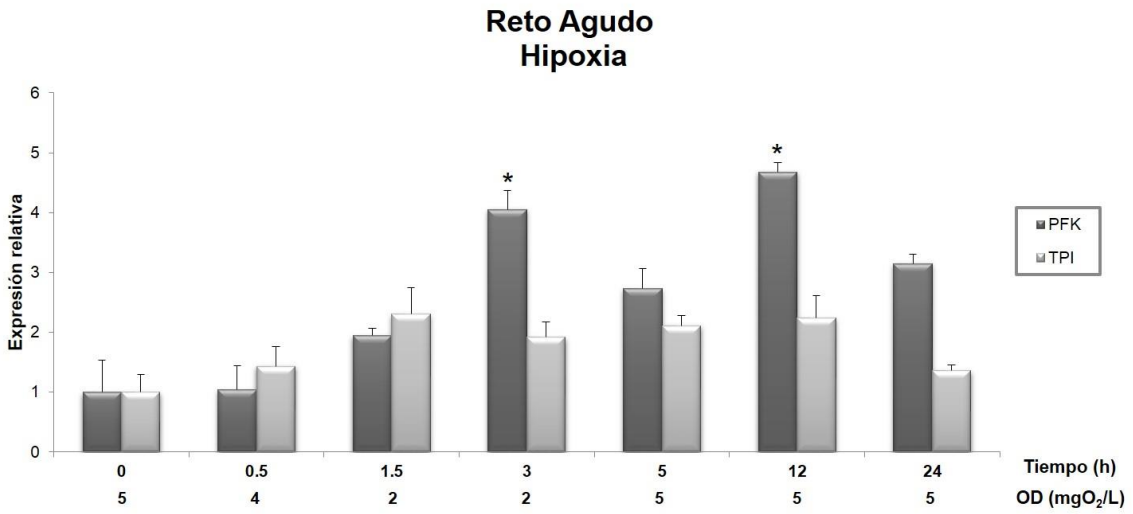

Figura 7. Expresión de genes del metabolismo de carbohidratos en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. La expresión relativa se expresa en función de los genes de referencia L8 y ubiquitina. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=5).PFK= Fosofofructocinasa, TPI= Triosa fosfato isomerasa

7.4.2. Metabolismo de lípidos

El nivel de expresión relativa de los genes de Acil-CoA sintetasa de cadena larga (ACS4) y carnitina palmitoil transferasa (CPT1) en el tejido de branquias de juveniles de camarón blanco expuestos a los retos agudos de hipertermia e hipoxia se muestran en las Figs. 8 y 9. En el reto agudo de hipertermia, no se observaron cambios significativos en el nivel de expresión de ACS4 con respecto al control. Por otro lado, en el caso de la exposición a hipoxia aguda, se observó una clara tendencia a incrementar la expresión de este gen conforme pasa el tiempo de exposición con diferencias significativas a las 3 h y 12 h. En el caso del gen CPT1, en el reto de hipertermia aun cuando se observó la tendencia a aumentar la expresión después de las 5 h, no se encontraron diferencias significativas en ningún punto. Para el reto de hipoxia solo se observó incremento significativo de la expresión respecto al control a las 12 h.

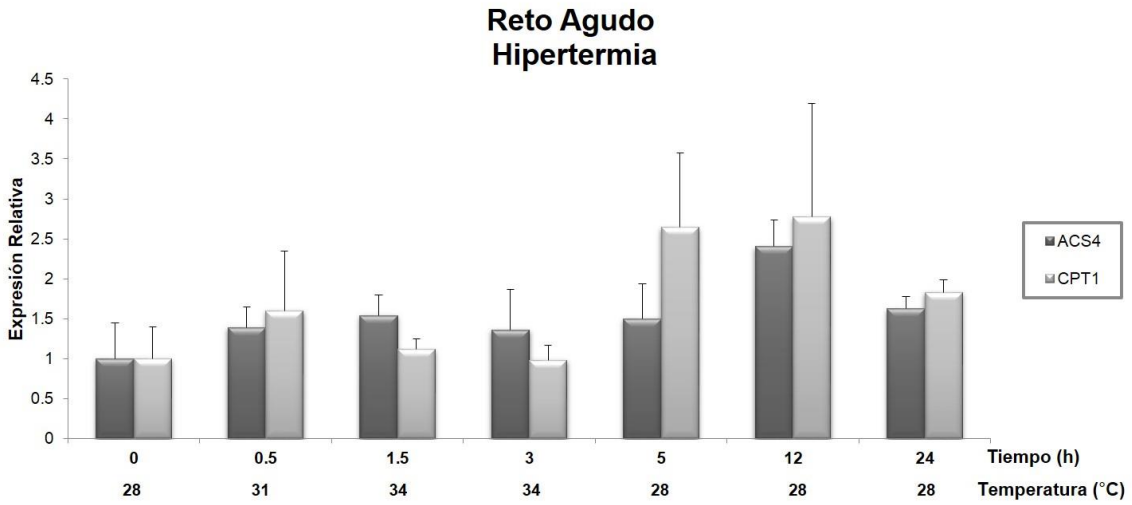

Figura 8. Expresión de genes del metabolismo de lípidos en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. La expresión relativa se expresa en función de los genes de referencia L8 y ubiquitina. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=5). ACS4= Acil-CoA sintetasa de cadena larga, CPT1= carnitina palmitoil transferasa 1

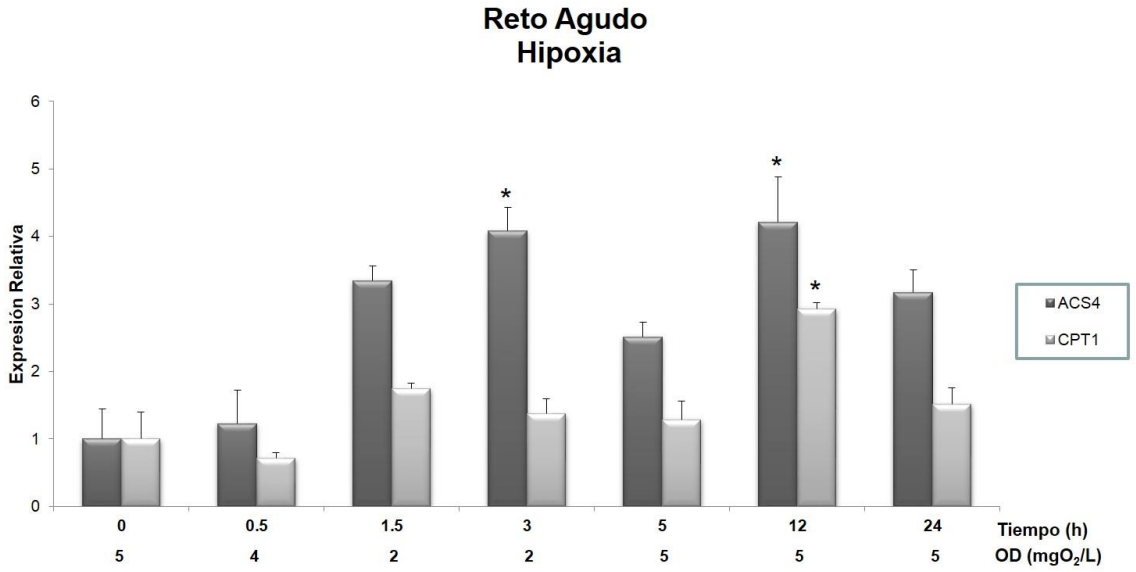

Figura 9. Expresión de genes del metabolismo de lípidos en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. La expresión relativa se expresa en función del gen de referencia ubiquitina. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=5). ACS4= Acil-CoA sintetasa de cadena larga, CPT1= carnitina palmitoil transferasa 1

7.4.3. Metabolismo de nucleótidos

El nivel de expresión relativa de los genes de la subunidad 4 de la ARN polimerasa II (RPB4) y xantina deshidrogenasa (XDH) en el tejido de branquias de juveniles de camarón blanco expuestos a los retos agudos de hipertermia e hipoxia se muestran en las Figs. 10 y 11. Para el reto agudo de hipertermia, se observó una tendencia a aumentar el nivel de expresión de RPB4 con cambios significativos con respecto al control a las 12 y 24 h. Por otro lado, en la exposición a hipoxia aguda, se observó un incremento en la expresión observando diferencias significativas a las 3, 5 y 12 h. En el caso del gen XDH, durante el reto de hipertermia se observó el incremento de la expresión respecto al control, a las 0.5, 1.5, 5 y 24 h, todos con diferencias significativas. En el reto de hipoxia, se observó una tendencia a aumentar desde el inicio de la exposición, con diferencias significativas a las 3 y 24 h.

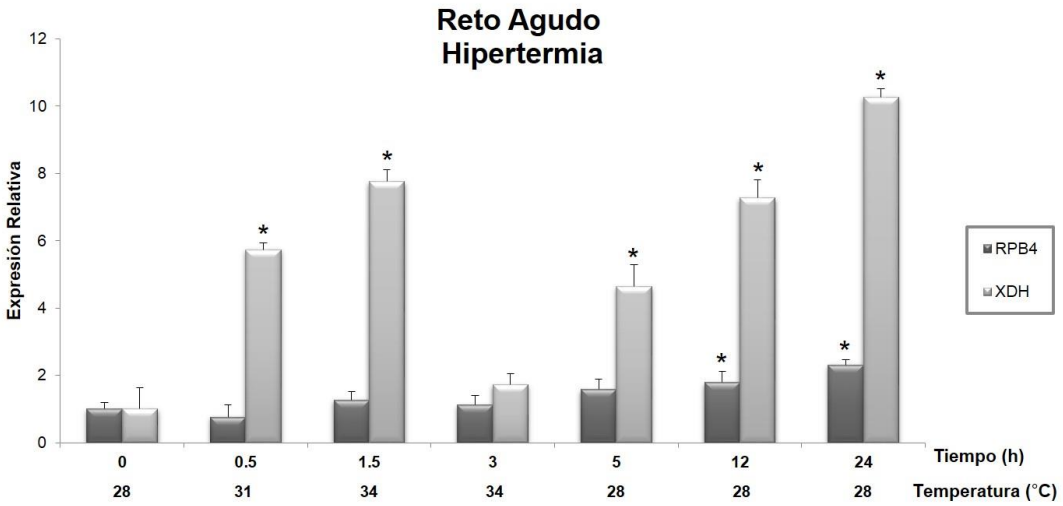

Figura 10. Expresión de genes del metabolismo de nucleótidos en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. La expresión relativa se expresa en función del gen de referencia ubiquitina. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). RPB4= ARN polimerasa II, sub 4, XDH= Xantina deshidrogenasa

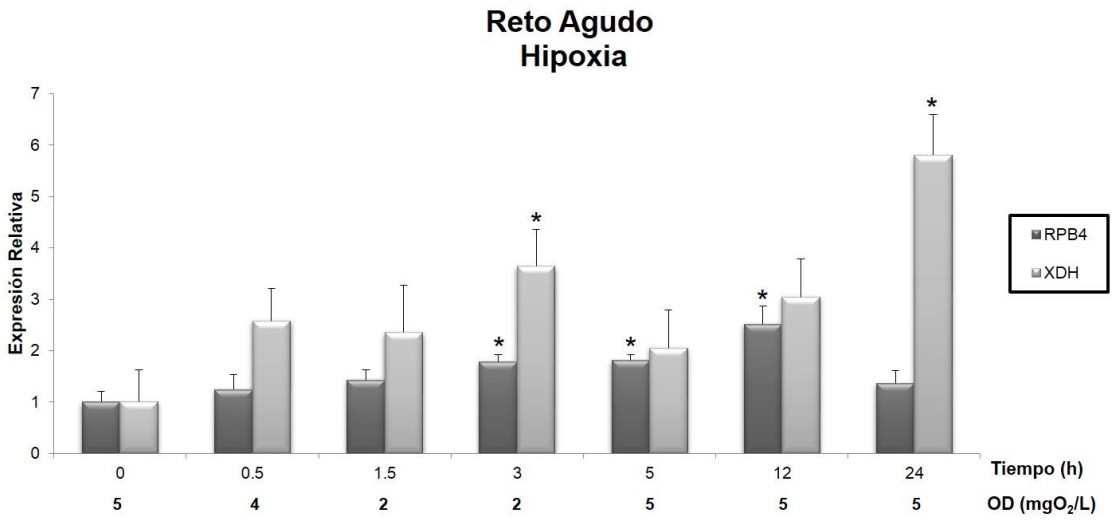

Figura 11. Expresión de genes del metabolismo de nucleótidos en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. La expresión relativa se expresa en función de los genes de referencia L8 y ubiquitina. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=5). RPB4= ARN polimerasa II, sub 4. XDH= Xantina deshidrogenasa

7.4.4. Ciclo de Krebs

El nivel de expresión relativa de los genes de citrato sintasa (CS) y succinato deshidrogenasa (SDHA) en el tejido de branquias de juveniles de camarón blanco expuestos a los retos agudos de hipertermia e hipoxia se muestran en las Figs. 12 y 13. Para el reto agudo de hipertermia, se observaron cambios significativos en el nivel de expresión de CS con respecto al control a las 1.5, 5, 12 y 24 h. En el caso de la exposición a hipoxia, se observó una clara tendencia a incrementar la expresión del gen CS conforme pasa el tiempo de exposición con diferencias significativas solo en los puntos de mayor expresión (1.5 y 12 h). En el caso del gen SDHA, no se observó ningún incremento significativo de la expresión respecto al control durante el reto de hipertermia, pero para el reto de hipoxia, se observó aumento de expresión con diferencias significativas a las 1.5, 3 y 12 h.

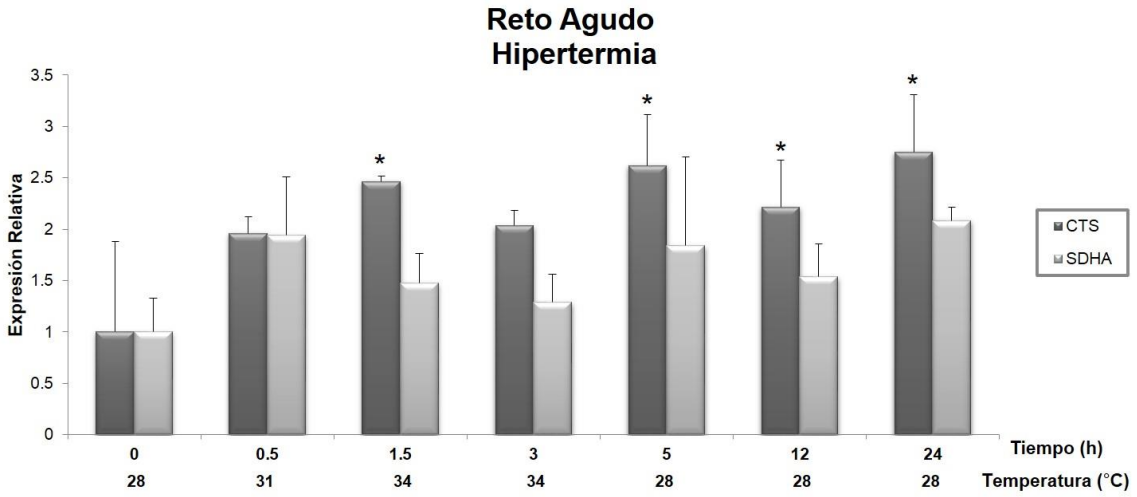

Figura 12. Expresión de genes del ciclo de Krebs en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. La expresión relativa se expresa en función de los genes de referencia L8 y ubiquitina. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=5). CTS= Citrato sintasa, SDHA= Succinato deshidrogenasa

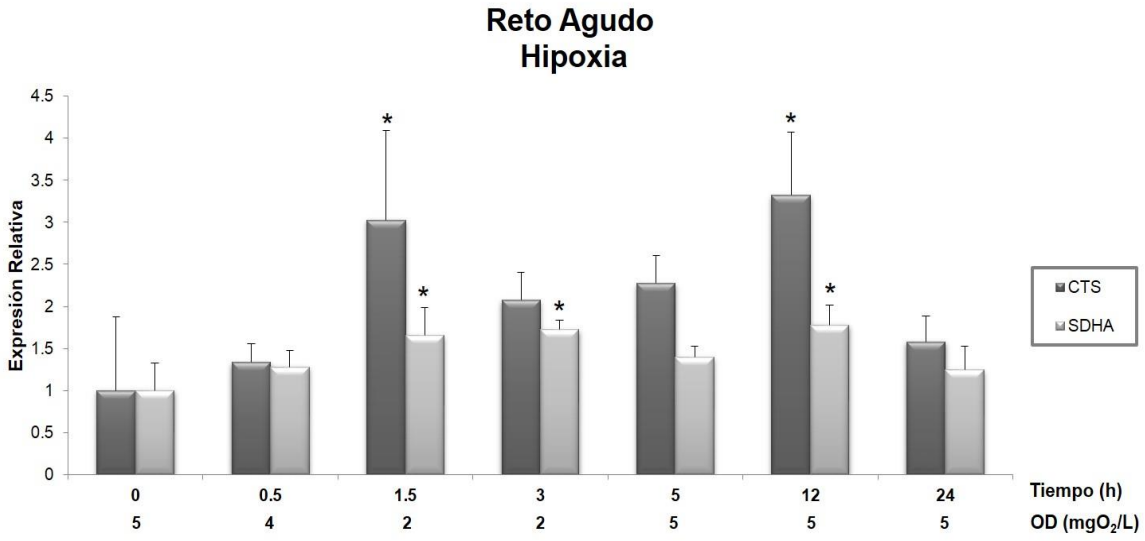

Figura 13. Expresión de genes del ciclo de Krebs en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. La expresión relativa se expresa en función de los genes de referencia L8 y ubiquitina. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=5). CTS= Citrato sintasa, SDHA= Succinato deshidrogenasa

7.4.5. Metabolismo anaerobio

El nivel relativo de expresión de los transcritos que codifican glucólisis (PFK, LDH1, LDH2) y las dos subunidades del factor inducido por hipoxia HIF-1 (α, β), en las branquias de L. vannamei expuestos a hipoxia a corto plazo se muestran en las Figs. 14 y 15. Las cantidades de transcripción de todos los genes cuantificados, mostró la tendencia a aumentar cuando los animales están expuestos a hipoxia, y durante el periodo de recuperación a las 12 h. Se observó una mayor concentración de transcritos con diferencias significativas de PFK, LDH1, LDH2 a las 3 y 12 h. para los transcritos de HIF-1α se observó un aumento con diferencias significativas a la hora (1 h) de exposición a hipoxia, y durante el periodo de recuperación (12, 24 h); por otro lado, los transcritos de HIF-1β mostraron un aumento con diferencias significativas durante todo el bioensayo con valores máximos durante el periodo de recuperación (12, 24 h).

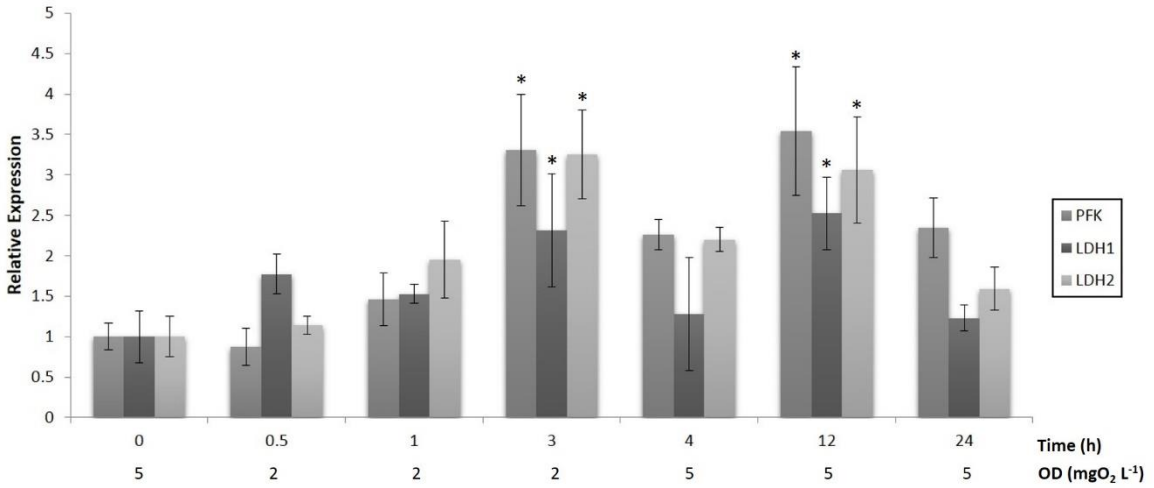

Figura 14. Expresión de genes de glucolisis anaerobia en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. La expresión relativa se expresa en función de los genes de referencia L8 y ubiquitina. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=5). PFK= fosfofructocinasa, LDH= lactato deshidrogenasa

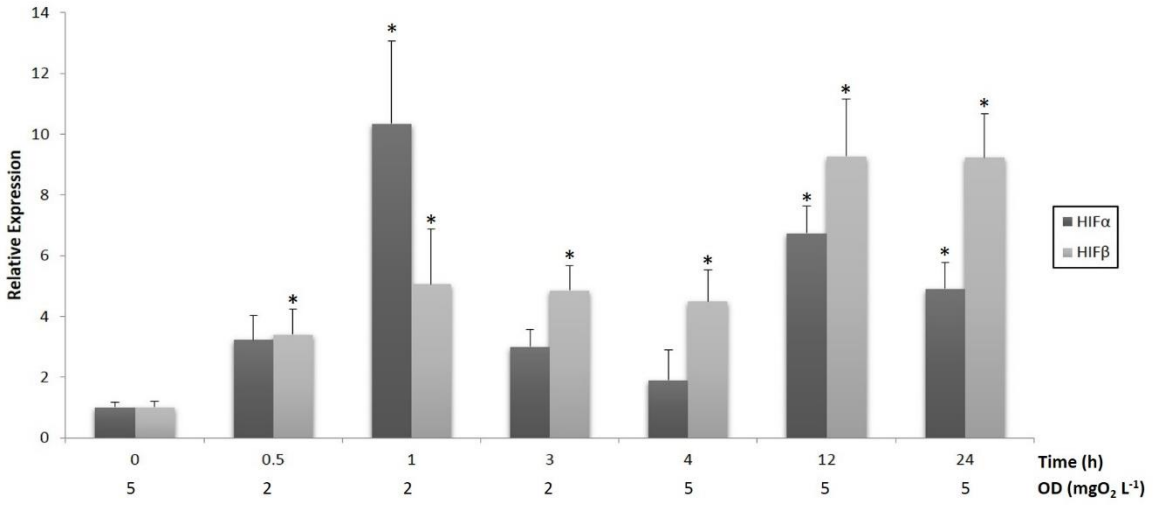

Figura 15. Expresión de genes de las subunidades del factor inducido por hipoxia (HIF) en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. La expresión relativa se expresa en función del gen de referencia ubiquitina. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=5).

7.4.6. Integración de variables

La integración de los resultados mediante el uso del método estadístico de análisis factorial se muestra en la Fig. 16. Se observaron tres grupos generados con este análisis, el primero de ellos (esquina superior derecha), agrupó genes del ciclo de Krebs (CS, SDHA), el contenido de carbohidratos en músculo, hepatopáncreas y branquias y el contenido de glucosa y lactato en hemolinfa. La segunda construcción (esquina inferior izquierda) agrupó variables relacionadas con la expresión génica del metabolismo anaerobio (HIF-1, PFK, LDH). Por último, hubo una tercera agrupación (esquina inferior derecha) donde el contenido de GCG muscular aparece por separado.

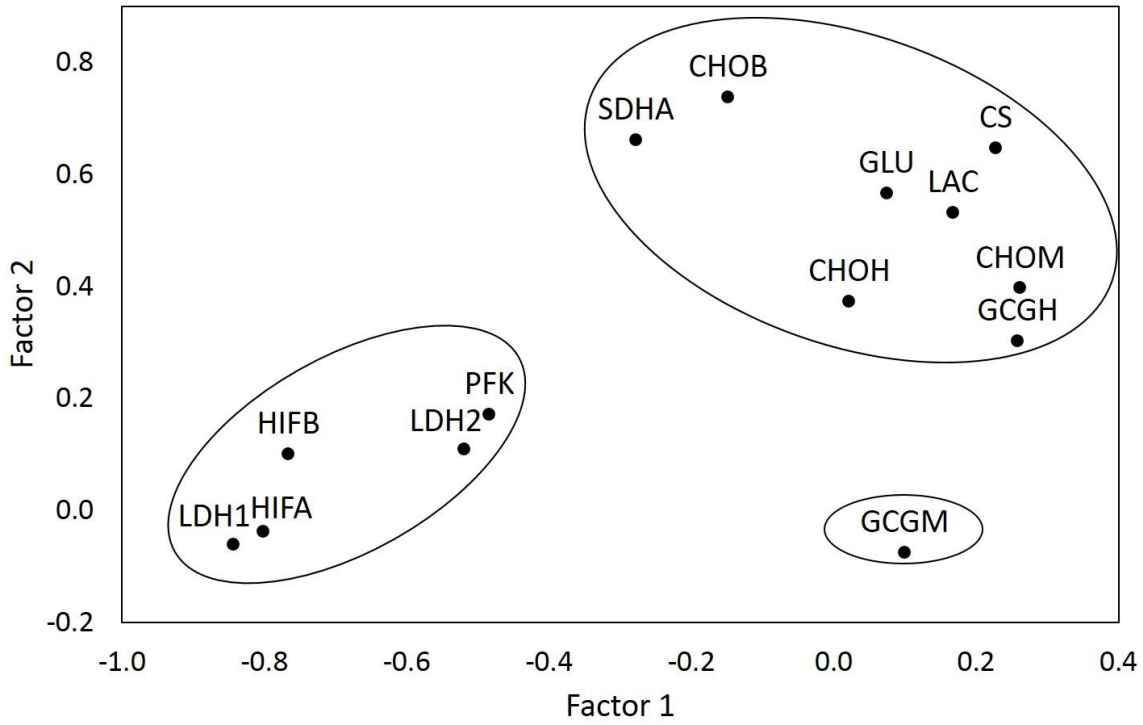

Figura 16. Análisis factorial por el método de componentes principales con rotación varimax para contenido de carbohidratos y expresión génica en tejidos de *L. vannamei* bajo hipoxia a corto plazo. Dos factores ortogonales con eigenvalores > 2 fueron utilizados para el análisis. Los círculos indican agrupación de variables. GLU, glucosa; LAC, lactato; GCGM, glucógeno muscular; GCGH, glucógeno de hepatopáncreas; CHOM, carbohidratos totales músculo; CHOH, carbohidratos totales de hepatopáncreas; CHOB, carbohidratos totales de branquias; PFK, fosfofructoquinasa; LDH, lactato deshidrogenasa; CS, citrato sintasa; SDHA, succinato deshidrogenasa subunidad A.

7.5. Análisis de expresión génica reto crónico

7.5.1. Metabolismo de carbohidratos

El nivel de expresión relativa de los genes de fosfofructocinasa (PFK), triosa fosfato isomerasa (TPI) y fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PEPCK) en el tejido de branquias de juveniles de camarón blanco expuestos a variaciones cíclicas de temperatura y oxígeno se muestran en las Fig. 17. Para la condición de hipertermia, solo se observó la disminución en el nivel de expresión de PFK,

durante el día 5. En la exposición a hipoxia, solo se observó una disminución de expresión con diferencias significativas en el segundo día de exposición. En el caso del gen TPI, durante hipertermia se observó la disminución de la expresión respecto al control a los 2 y 5 días, y el aumento al final del bioensayo para el día 24. En caso de exposición a hipoxia, se observó el aumento de la expresión de este gen los días 5 y 24 de muestreo. Para el gen PEPCK, durante hipertermia se observó la disminución de la expresión respecto al control al día 5, y aumento significativo los días 14 y 24. En caso del efecto de la exposición a hipoxia en la expresión de este gen, se observó un aumento significativo los días 5, 14 y 24.

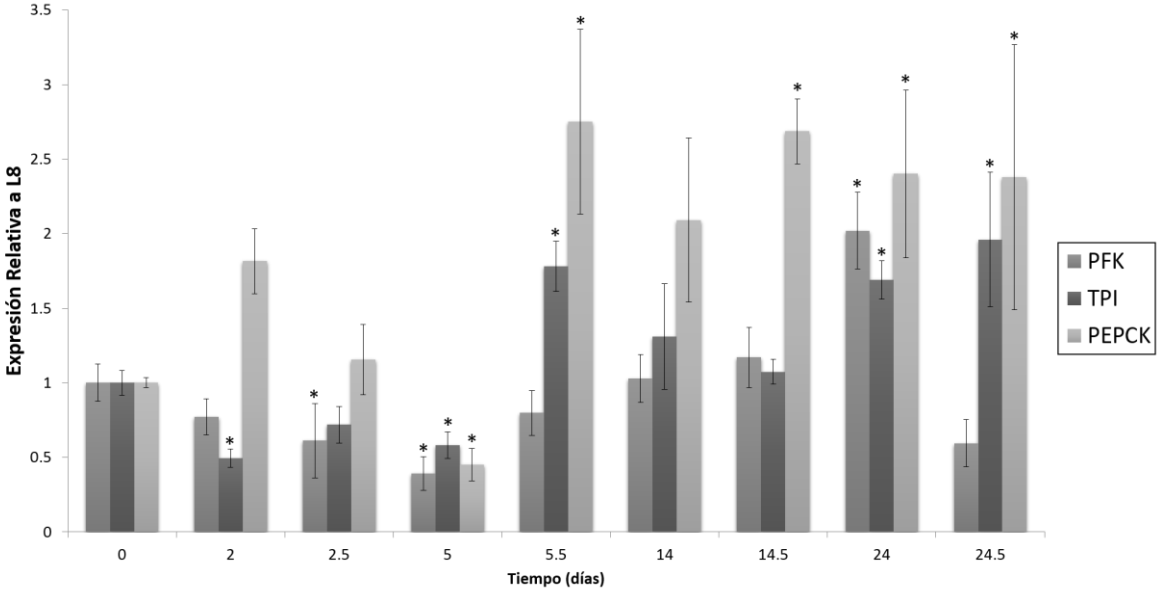

Figura 17. Expresión de genes del metabolismo de carbohidratos en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico de hipertermia e hipoxia. La expresión relativa se expresa en función del gen de referencia L8. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=5). PFK= Fosfofructocinasa TPI= Triosa fosfato isomerasa PEPCK= Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa mitocondrial

7.5.2. Metabolismo de lípidos

El nivel de expresión relativa de los genes de Acil-CoA sintetasa de cadena larga (ACS4), carnitina palmitoil transferasa (CPT1) y succinyl-CoA:3-cetoacido Co-A transferasa (SCOT) en el tejido de branquias de juveniles de camarón blanco expuestos a variaciones cíclicas de temperatura y oxígeno se muestran en la Fig. 18. En el caso del gen ACS4, se observó una clara tendencia a disminuir su expresión durante todo el bioensayo, con diferencias significativas durante el día 5 para hipertermia y los días 2 y 14 para hipoxia. En el caso del gen CPT1, durante hipertermia solo se observó la disminución de la expresión respecto al control el día 5 y para la exposición a hipoxia, se observó la disminución de la expresión de este gen el día 2. Para el gen SCOT, durante hipertermia se observó disminución de la expresión respecto al control el día 5, y en el caso del efecto de la hipoxia, se observó disminución los días 2 y 24.

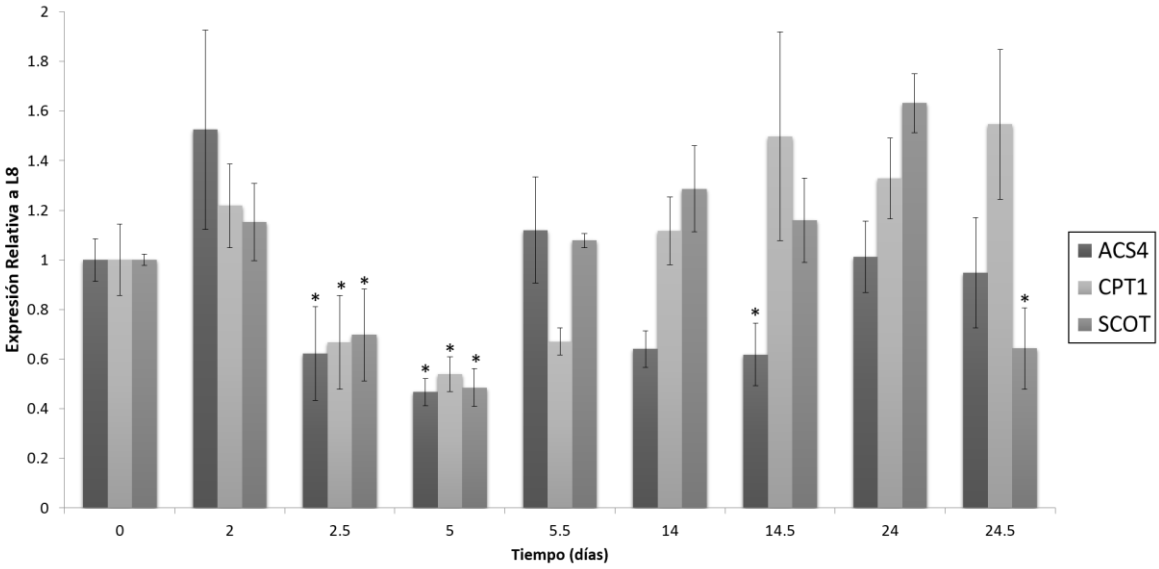

Figura 18. Expresión de genes del metabolismo de lípidos en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico de hipertermia e hipoxia. La expresión relativa se expresa en función del gen de referencia L8. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=5).

7.5.3. Ciclo de Krebs

El nivel de expresión relativa de los genes de citrato sintasa (CS), succinato deshidrogenasa subunidad A (SDHA) y citrato liasa dependiente de ATP (ATPCL) en el tejido de branquias de juveniles de camarón blanco expuestos a variaciones cíclicas de temperatura y oxígeno se muestran en la Fig. 19. En el caso del gen CS, solo se observó una disminución en el nivel de expresión durante el día 2 durante la exposición a hipoxia. Para el gen SDHA, durante hipertermia no se observaron cambios significativos de la expresión respecto al control y en los periodos de exposición a hipoxia, se observó disminución de expresión el día 2 y aumento el día 24. Por otro lado, para el gen ATPCL, durante hipertermia se observó disminución de la expresión respecto al control los días 2 y 5; sin embargo, para el final del bioensayo hubo un aumento significativo el día 24. En caso del efecto de la exposición a hipoxia en la expresión de este gen, solo se observó disminución el día 24.

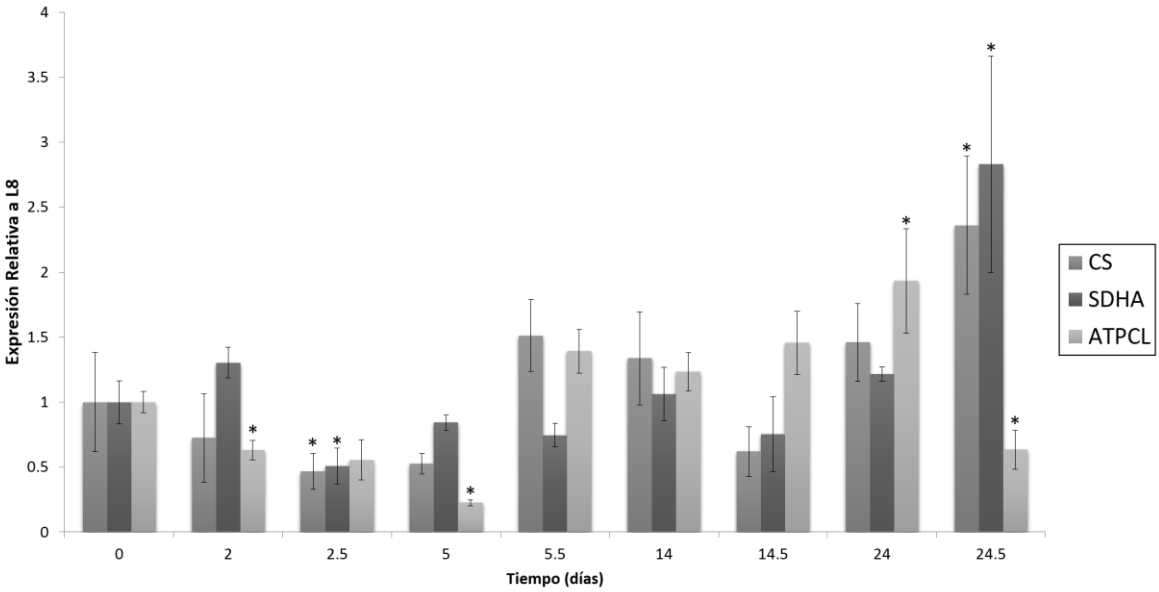

Figura 19. Expresión de genes del ciclo de Krebs en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico de hipertermia e hipoxia. La expresión relativa se expresa en función del gen de referencia L8. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=5). CS= Citrato sintasa, SDHA= Succinato deshidrogenasa, ATPCL=ATP citrato liasa

7.5.4. Metabolismo de aminoácidos

El nivel de expresión relativa de los genes de Fumaryl Acetoacetato Hidrolasa (FAH) y Propionil Co-A Carboxilasa Subunidad B (PCCB) en branquias de juveniles de camarón blanco expuestos a variaciones cíclicas de temperatura y oxígeno se muestran en la Fig. 20. En el caso del gen FAH, se observó disminución en el nivel de expresión, durante el día 5 y aumento el día 24 durante la exposición a hipertermia, sin cambios durante la exposición a hipoxia. Para el gen PCCB, durante hipertermia disminuyó la expresión respecto al control el día 5 y aumentó los días 14 y 24. En el caso de los periodos de hipoxia, solo se observó una disminución de la expresión el día 2.

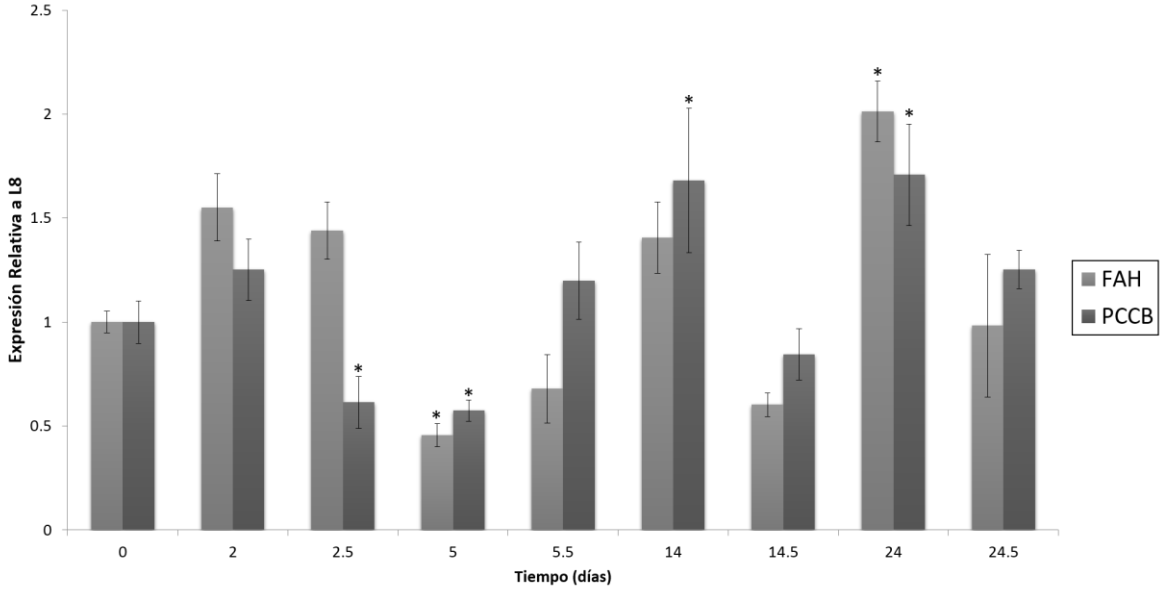

Figura 20. Expresión de genes del metabolismo de aminoácidos en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico de hipertermia e hipoxia. La expresión relativa se expresa en función del gen de referencia L8. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=5). FAH= Fumaryl Acetoacetato Hidrolasa, PCCB= Propionil Co-A Carboxilasa Subunidad B

El nivel de expresión relativa de los genes citosólico (GOT1) y mitocondrial (GOT2) de la aspartato aminotransferasa en branquias de juveniles de camarón blanco expuestos a variaciones cíclicas de temperatura y oxígeno se muestran en la Fig. 21. Para el gen GOT1, durante la hipertermia disminuyó la expresión respecto al control el día 5 y aumentó durante la hipoxia los días 5 y 14. En el caso del gen GOT2, aumentó la expresión de este gen en los periodos de hipertermia los días 14 y 24, y disminuyó el día 2 durante la exposición a hipoxia.

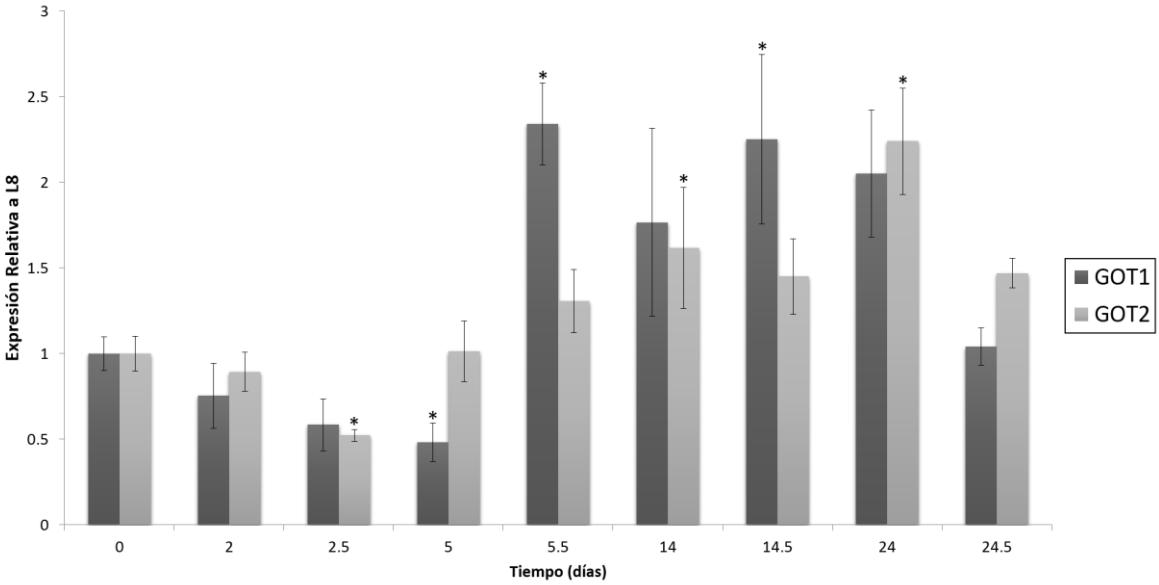

Figura 21. Expresión de los genes citosólico (GOT1) y mitocondrial (GOT2) de la aspartato aminotransferasa en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico de hipertermia e hipoxia. La expresión relativa se expresa en función del gen de referencia L8. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=5).

7.5.5. Metabolismo del fosfágeno arginina quinasa

El nivel de expresión relativa del gen arginina quinasa (AK) en el tejido de branquias de juveniles de camarón blanco expuestos a variaciones cíclicas de temperatura y oxígeno se muestran en la Fig. 22. Durante la exposición a hipertermia, aunque se observó la tendencia a disminuir la expresión desde el inicio del bioensayo, se encontraron diferencias significativas hasta el día 5; sin embargo, pasado este periodo empezó a aumentar el nivel de expresión de AK observando cambios significativos con respecto al control el día 24. Por otro lado, en los periodos de la exposición a hipoxia, se observó una tendencia similar a lo ocurrido con la hipertermia sin diferencias significativas en la disminución de expresión durante los primeros días, pero observando aumento significativo en la expresión los días 14 y 24.

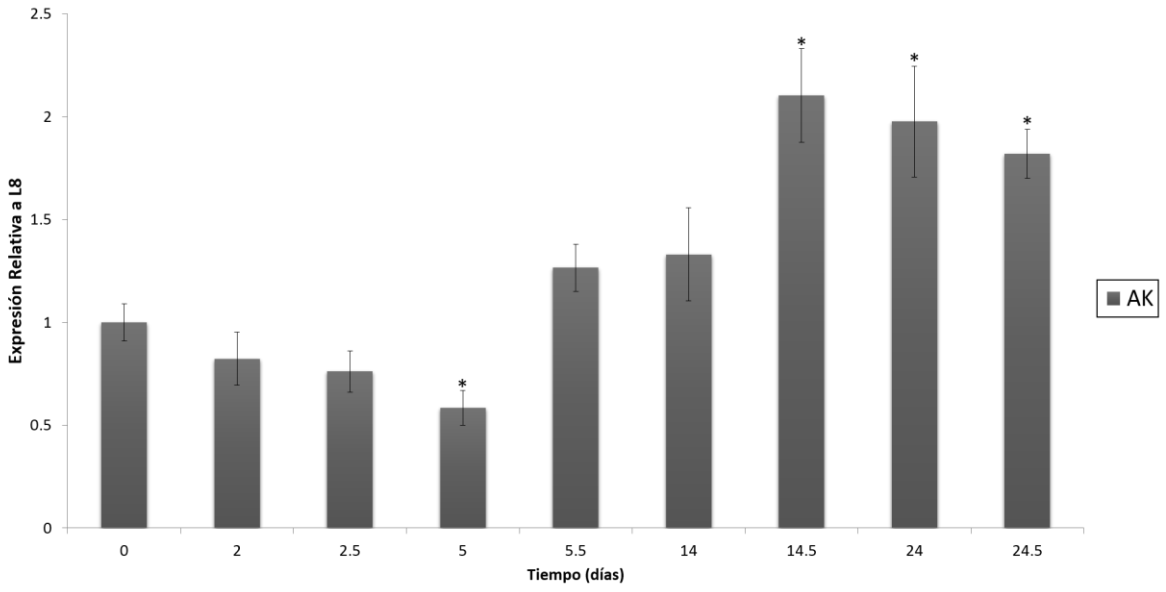

Figura 22. Expresión del gen del arginina quinasa en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico de hipertermia e hipoxia. La expresión relativa se expresa en función del gen de referencia L8. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=5). AK= Arginina quinasa

7.5.6. Metabolismo anaerobio

El nivel de expresión relativa de los genes fosfofructocinasa (PFK), y lactato deshidrogenasa isoformas 1 y 2 (LDH), en branquias de juveniles de camarón blanco expuestos a variaciones cíclicas de temperatura y oxígeno se muestran en la Fig. 23. Para la condición de hipertermia, solo se observó la disminución en el nivel de expresión de PFK, durante el día 5 y durante la exposición a hipoxia, solo hubo diferencias significativas en el segundo día de exposición. Para el gen LDH1, se observaron cambios significativos de la expresión respecto al control para el día 24 del bioensayo aumentando en la exposición a hipertermia y disminuyendo durante la exposición a hipoxia. Por otro lado, para el gen LDH2, solo se observó una disminución en la expresión de este gen el día 5 durante la exposición a hipertermia.

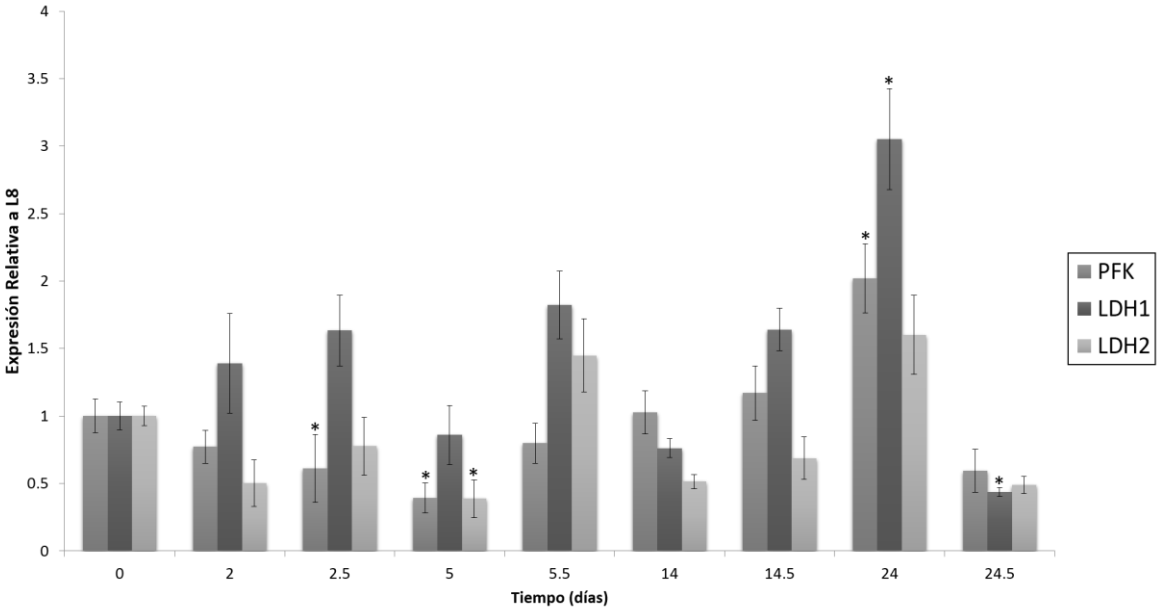

Figura 23. Expresión de genes involucrados en el metabolismo anaerobio en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico de hipertermia e hipoxia. La expresión relativa se expresa en función del gen de referencia L8. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=5). (n=5). PFK= Fosfofructocinasa, LDH= Lactato deshidrogenasa

El nivel de expresión relativa de los genes de ambas subunidades del factor inducido por hipoxia (HIF-1 α y β) en branquias de juveniles de camarón blanco expuestos a variaciones cíclicas de temperatura y oxígeno se muestran en la Fig. 24. En el caso de la subunidad alfa del gen HIF-1, se observó la tendencia a aumentar durante todo el bioensayo durante ambas condiciones estresantes, con diferencias significativas los días 14 y 24 para hipertermia y el día 24 para hipoxia. Al contrario del gen codificante para la subunidad α, el gen HIF-1β tuvo una marcada tendencia a disminuir su expresión con diferencias el día 5 durante la exposición a hipertermia y los días 2 y 5 en condiciones de hipoxia.

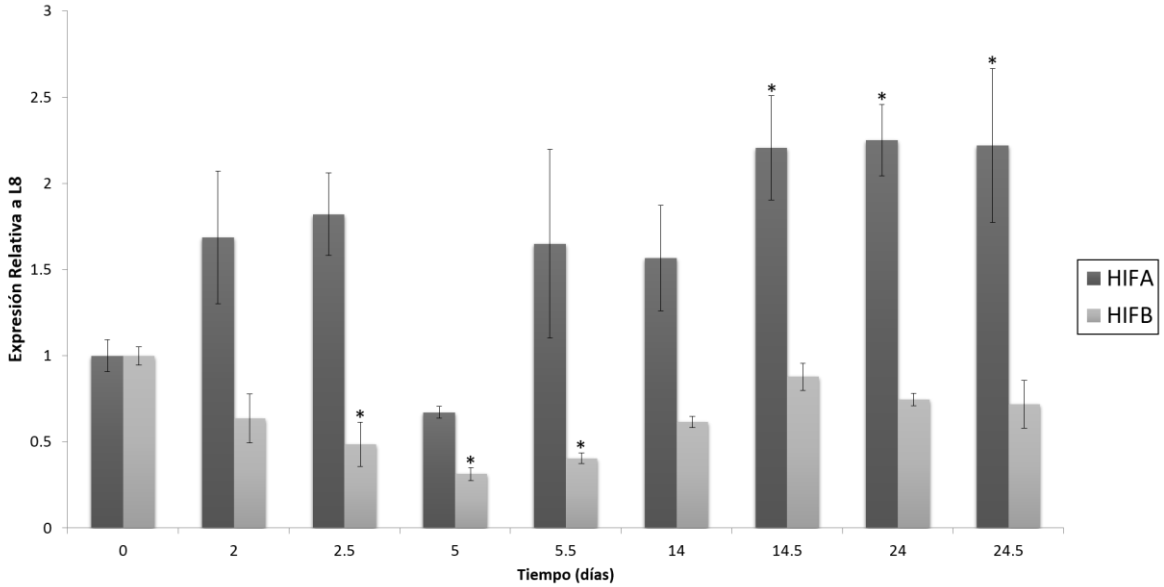

Figura 24. Expresión de los genes HIF-1α y HIF-1β en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico de hipertermia e hipoxia. La expresión relativa se expresa en función del gen de referencia L8. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=5).

7.5.7. Proteínas de choque térmico HSP70 y HSP90

El nivel de expresión relativa de los genes de las proteínas de choque térmico HSP70 y HSP90, en el tejido de branquias de juveniles de camarón blanco expuestos a variaciones cíclicas de temperatura y oxígeno se muestran en la Fig. 25. En el caso ambos genes, se observó una clara tendencia a aumentar su expresión en los periodos de hipertermia y disminuir en los de hipoxia durante todo el bioensayo. En el caso del gen HSP70, se observó un aumento en la expresión los días 14 y 24 durante hipertermia y una disminución los días 2 y 14 durante hipoxia. Para el gen HSP90, para hipertermia la expresión aumentó los días 2 y 24, y disminuyó durante los días 2, 14 y 24 durante los periodos de hipoxia.

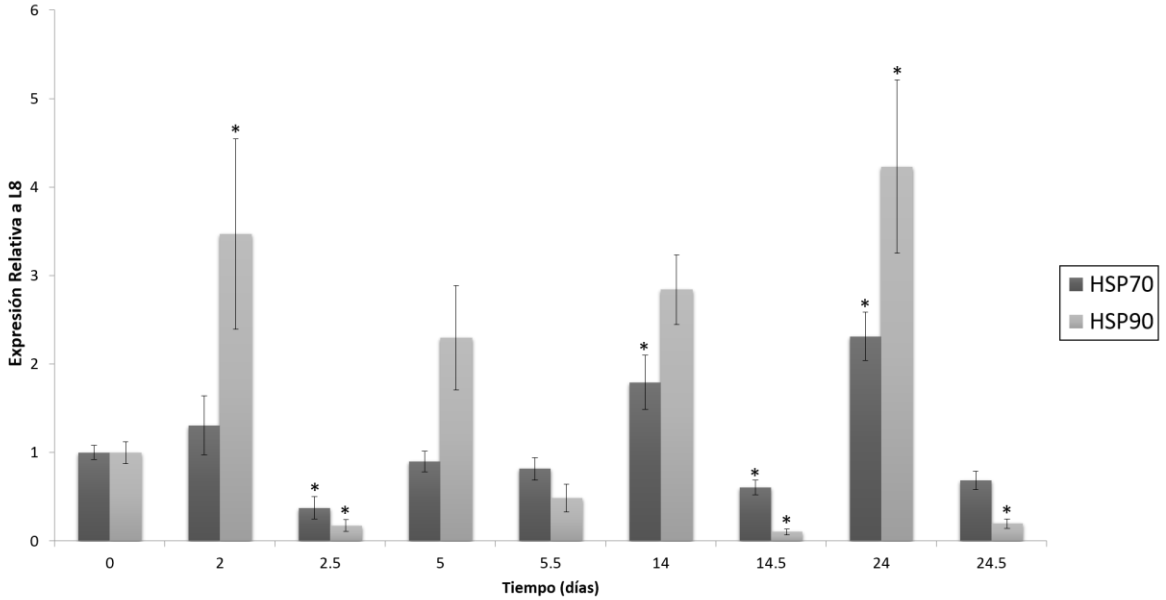

Figura 25. Expresión de los genes que codifican las proteínas de choque térmico HSP70 y HSP90 en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico de hipertermia e hipoxia. La expresión relativa se expresa en función del gen de referencia L8. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=5).

7.5.8. Análisis de expresión génica global

Los resultados obtenidos tomando la expresión de todos los genes analizados como una respuesta global de expresión génica, se muestran en la Fig. 26. Se identificó que en el corto plazo se regula negativamente la expresión de la mayoría de los genes (≥50% genes sub-expresados hipoxia día 2, hipertermia día 5); a los 14 días, la expresión global (>50%) regresa a valores similares a los encontrados en los organismos antes de la exposición al estrés, y en el largo plazo se regula positivamente la expresión (≥50% genes sobre-expresados).

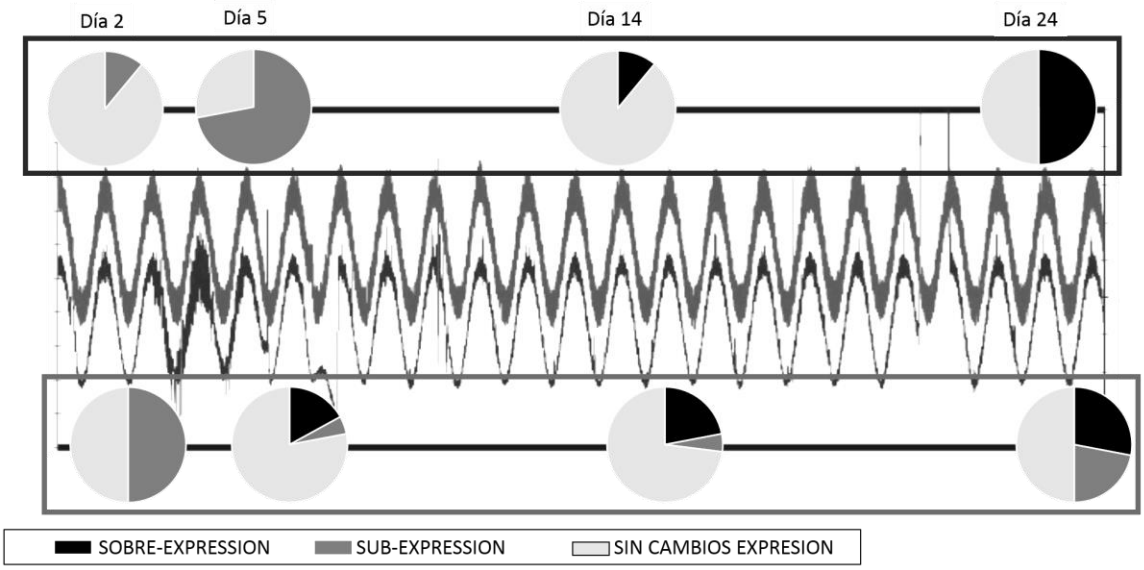

Figura 26. Porcentaje de cambio en expresión de los genes cuantificados en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico de hipertermia e hipoxia.

8. DISCUSIÓN

8.1. Tolerancia térmica de PL de *L. vannamei* a condiciones combinadas de hipertermia e hipoxia

La tolerancia térmica de un individuo es una respuesta específica de la especie que puede variar según la edad, el peso, la disponibilidad de alimento, la estación, y la calidad del agua, entre otros factores (Diana, 1983; Giattina y Garton 1982; Wedemeyer *et al*., 1999). La temperatura que un organismo prefiere, generalmente coincide con la temperatura óptima que requiere para moverse, crecer o reproducirse, ya que esto le permite maximizar su eficiencia energética (Beitinger y Fitzpatrick 1979; Kelsch, 1996; McCauley y Casselman 1981); sin embargo, cuando se presentan variaciones de temperatura ambiental los animales se ven forzados a utilizar diferentes estrategias y mecanismos que les permiten afrontar estos cambios (Hochachka y Somero, 2002). En la mayoría de los casos, los organismos realizan un aumento en su tasa metabólica estándar como principal respuesta a condiciones de hipertermia; por lo cual, se ha propuesto que dependen de un flujo continuo y adecuado de oxígeno desde su entorno, para mantener el elevado costo energético provocado por el incremento de temperatura (Pörtner, 2010).

El nivel de hipoxia utilizado en este estudio (2 mgO_2/L) disminuyó la tolerancia térmica de PL de *L. vannamei*, en temperaturas cercanas al límite térmico superior de la especie (>36 °C). En nuestro estudio, la disminución de la tolerancia térmica puede ser explicada por la hipótesis de tolerancia térmica limitada por la capacidad y el oxígeno (OCLTT) (Pörtner *et al*., 2001; Pörtner *et al*., 2017), ya que esta hipótesis supone que: si se sabe que la hipertermia aumenta la tasa metabólica, entonces, en temperaturas extremas, la capacidad de suministro de oxígeno en tejidos se verá limitada en relación con la demanda; y por lo tanto, una

menor disponibilidad de oxígeno ambiental limitara la tolerancia térmica de los organismos, ya que no podrán compensar de manera óptima el incremento en su metabolismo.

A 40 °C y temperaturas menores o iguales a 36 °C, la exposición simultánea a hipoxia (2 mgO_2/L) no afectó la tolerancia térmica (LT_{50}, LR_{50}) de *L. vannamei*. Los crustáceos, utilizan diferentes estrategias para hacer un uso más eficiente del oxígeno en respuesta a hipoxia, entre las cuales destacan: la disminución del metabolismo, el incremento en el contenido y capacidad de unión de moléculas de oxígeno a hemocianina en hemolinfa y el aumento en su tasa de ventilación branquial (McMahon, 2001). En este trabajo, la hipoxia dejó de afectar la tolerancia térmica (LT_{50}, LR_{50}) de *L. vannamei* en temperaturas menores o iguales a 36 °C; en este caso, los mecanismos de respuesta a hipoxia mencionados arriba, pueden explicar esta respuesta, ya que la alta demanda energética provocada por la hipertermia, pudo en cierta forma ser subsanada por estos mecanismos mientras la demanda de oxigeno no fuera tal, que sobrepasará la capacidad de respuesta del organismo. Por otro lado, a la temperatura de 40 °C, tampoco se observó un efecto de las condiciones combinadas sobre la tolerancia térmica (LT_{50} y LR_{50}) de *L. vannamei*, a diferencia del caso anterior, en este nivel de hipertermia se considera que la alta temperatura por sí sola, causó suficiente daño a los organismos para provocar la mortalidad de los organismos y no observar diferencias cuando el nivel de oxígeno era menor.

8.2. Cambios en la expresión génica en respuesta a hipertermia e hipoxia

La hipertermia y la hipoxia como agentes estresores durante una exposición aguda, modifican la expresión de genes involucrados en rutas metabólicas en los camarones. En décadas recientes, se ha propuesto que durante condiciones de

estrés los camarones utilizan el almacenamiento y utilización de carbohidratos o lípidos en tejidos por efecto del manejo (Aparicio-Simón *et al*., 2010), hipoxia (Hall y Van Ham, 1998), hipertermia (Carreño-Mejía, 2009; Ulaje-Fernández, 2015), muestreos repetitivos de hemolinfa (Racotta y Palacios, 1998), y exposición a altas concentraciones de amonio (Mugnier y Justou, 2004), entre otros. Además de esta información, diversos estudios han reportado las respuestas a nivel de expresión génica, para dilucidar los mecanismos utilizados por los camarones para compensar condiciones estresantes; observando que, particularmente en el caso de hipertermia e hipoxia esta respuesta se relaciona con la activación de genes involucrados en rutas de utilización y obtención de energía, y reparación celular (Gorr *et al*., 2010; Logan y Somero, 2010; Ulaje-Fernández, 2015).

8.2.1. Respuesta a hipertermia aguda

En el reto agudo de temperatura, observamos un aumento en la expresión de los genes de rutas metabólicas de glucolisis, ciclo de Krebs y metabolismo de nucleótidos. La función fisiológica de la enzima triosa fosfato isomerasa (TPI), es ajustar el equilibrio entre el fosfato de dihidroxiacetona y el gliceraldehído-3-fosfato (G3P) favoreciendo la formación de G3P en la glicólisis, esta enzima se considera está interconectada a la vía de las pentosas fosfato y al metabolismo lipídico a través de los trifosfatos formados (Gess, *et al.,* 2004; Tornheim y Ruderman, 2011). En la exposición de *L. vannamei* a hipertermia aguda, se observó la sobreexpresión del gen codificante para TPI 24 h después de la exposición, sugiriendo que esta enzima ayuda a reponer el equilibrio energético del organismo mediante la glucolisis, ya que se ha observado en trabajos anteriores que la energía libre (potencial de crecimiento) de los camarones se recupera pasado este periodo de tiempo (Ulaje-Fernández, 2015).

La sobre-expresión del gen que codifica la enzima citrato sintasa (CS) durante la exposición a hipertermia aguda, sugiere que esta enzima es fundamental para responder al efecto de la hipertermia en camarones y que la regulación en la expresión es principalmente trsncripcional. Los camarones peneidos aumentan su tasa respiratoria (metabolismo) como principal respuesta a condiciones de hipertermia; y por lo tanto, la producción de ATP a través del metabolismo aerobio se ve comprometida (Ponce-Palafox *et al*., 1997; Pörtner, 2010; Wang *et al*., 2006; Wyban *et al*., 1995). En este sentido, el aumento de expresión del gen CS observado durante la exposición a hipertermia en nuestro trabajo, sugiere que la activación del ciclo de Krebs es de vital importancia para que la mitocondria pueda obtener compuestos reducidos (NADH, FADH), realizar el intercambio de electrones y protones mediante la cadena respiratoria y producir o mantener la cantidad necesaria de energía (ATP) que requiere la célula durante esta condición estresante.

En últimas décadas se han elucidado algunos de los mecanismos utilizados en términos de expresión de genes para responder a diferentes tipos de factores de estrés; sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos de respuesta del aparato mismo de transcripción antes y después del periodo estresante. En este trabajo, después de que los organismos fueran expuestos a la hipertermia aguda, en el periodo considerado de recuperación (28 ºC, 12 y 24 h después de la exposición) se observó un incremento en la expresión del gen codificante de la subunidad 4 de la ARN polimerasa II (RPB4), enzima que ante condiciones de estrés favorece la síntesis de ARNm de la polimerasa. Estos resultados nos indican que una vez pasado el evento estresante, la célula busca restaurar las rutas afectadas por la condición de hipertermia y la recuperación dependerá de la capacidad de esta enzima para aumentar la transcripción de genes relacionados con rutas que subsanen el daño ocasionado por el estrés (Choder y Young, 1993).

En respuesta a hipertermia aguda, se observa un aumento en la expresión del gen codificante para la enzima xantina deshidrogenasa (XDH), la cual está involucrada en la degradación de nucleótidos y la formación de especies reactivas de oxígeno. La XDH interviene en la etapa final del catabolismo de las purinas, esta enzima realiza la conversión de la hipoxantina en xantina y después xantina en ácido úrico. En esta reacción, XDH utiliza NAD^+ preferentemente como aceptor de electrones; sin embargo, XDH tiene la capacidad de convertirse en xantina oxidasa (XO), y en este caso, su aceptor de electrones preferido es el oxígeno molecular dando como resultado la formación de superóxido y peróxido de hidrógeno (Kayyali *et al*., 2001). En los resultados encontrados en este trabajo, hay un aumento significativo en la expresión de este gen cuando empieza la exposición a hipertermia, y aunque pasadas las 2 h de exposición, la expresión tiene valores similares a los basales, en el periodo considerado de recuperación (28 ºC, 12 y 24 h después de la exposición) se observó de nuevo el incremento en la expresión de este gen. Estas variaciones probablemente ocurren debido a que como respuesta inmediata, la célula produce enzimas que puedan proveer compuestos reducidos (NADH) para obtener energía y afrontar el incremento del metabolismo; sin embargo, cuando la exposición se prolonga, las células de las branquias previenen el daño oxidativo que puede ser causado por la sobreproducción de esta enzima (regresando a valores basales); y después, cuando la condición de estrés ha pasado, se induce su expresión para reestablecer su energía y ayudar en el recambio de nucleótidos como parte del proceso de recuperación.

8.2.2. Respuesta a hipoxia aguda

La principal respuesta al estrés por hipoxia observada en camarones fue el aumento en la expresión de genes de rutas metabólicas de glucolisis, degradación de ácidos grasos, metabolismo de nucleótidos y ciclo de Krebs. Las branquias son

un tejido que se encuentra directamente involucrado en la respiración y destoxificación de los camarones y se sabe que, como respuesta al estrés por hipoxia, se induce la glucolisis anaerobia en este tejido (Racotta *et al*., 2002). En este trabajo se observó un incremento en la expresión del gen que codifica la enzima fosfofructoquinasa (PFK), lo que sugiere desde el punto de vista metabólico que la enzima PFK al ser clave en la regulación de la glucolisis, aumenta su actividad para hacer frente a la demanda de degradación de glucosa, acelerando el proceso de producción de ATP de forma anaerobia. Para hepatopáncreas se ha observado una respuesta similar bajo estrés por hipoxia con la sobreexpresión de los genes fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBF), PFK, hexoquinasa y lactato deshidrogenasa; debido a la activación del factor inducido por hipoxia (HIF), que se presume regula la activación de genes relacionados con el metabolismo anaerobio para contrarrestar a los posibles daños causados por el estrés (Sonanez-Organis *et al*., 2009; Sonanez-Organis *et al*., 2012; Cota-Ruiz *et al*., 2015; Cota-Ruiz *et al*., 2016).

Además de lo anterior, en respuesta a hipoxia aguda, podemos proponer que en camarones el uso e integración de varias rutas metabólicas es esencial para contrarrestar la demanda de oxígeno, ya que también se observan aumentos en expresión de genes codificantes de enzimas del metabolismo de lípidos. Las enzimas Acil-CoA sintetasa (ACS) se encargan de la síntesis del grupo Acil-CoA a partir de ácidos grasos, siendo esta reacción el paso de activación para su degradación mediante la β-oxidación o incorporación en la membrana como fosfolípidos (Cao *et al*., 1998). Particularmente ACS4 tiene afinidad con el ácido araquidónico (ARA); lo cual sugiere, que en respuesta a hipoxia la sobreexpresión del gen que codifica esta enzima, provoca que este ácido graso se active para reparar las membranas que son afectadas por este tipo de estrés o sea utilizado a nivel energético. También se observó incremento en la expresión del gen codificante para la enzima carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT1), pasado el

evento estresante; enzima que se encarga del transporte de ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana mitocondrial mediante su unión a moléculas de carnitina para ser degradados en la matriz (Zammit, 2008). Lo anterior insinúa, que pasado el periodo de estrés el organismo tiene la capacidad de compensar el efecto de la exposición aguda mediante la obtención de energía usando ácidos grasos como sustrato, y el uso de este mecanismo junto con las demás respuestas metabólicas provoca que 24 h pasado el estrés por hipoxia, se restablezcan tasas fisiológicas como la ingesta y la respiración, y no se observen cambios en el balance energético (Ulaje-Fernández, 2015).

Los camarones durante la exposición a hipoxia aguda, modifican su obtención de energía a través de la expresión de genes del ciclo de Krebs. En el caso del gen codificante para la subunidad A de la enzima succinato deshidrogenasa (SDHA), también se observó un incremento significativo de expresión. La succinato deshidrogenasa (SDH) es una enzima muy importante dentro del metabolismo energético, ya que conecta el ciclo de Krebs con la fosforilación oxidativa, mediante la oxidación del succinato al fumarato como componente del ciclo de Krebs y la ubiquinona a ubiquinol en la cadena de transporte de electrones, siendo la subunidad A la encargada de la primera reacción (Huang y Millar, 2013). En este trabajo encontramos que la SDHA se sobreexpresa durante la exposición a hipoxia, sugiriendo que esta enzima promueve el aumento en la actividad tanto del ciclo de Krebs como de la fosforilación oxidativa para hacer frente a la disminución en el oxígeno ambiental. Además, se observó un incremento en la expresión del gen de la citrato sintasa (CS) enzima inicial del ciclo de Krebs, de la cual se sabe que su actividad aumenta para mantener la producción de ATP (Zak *et al*., 2017), enzima que es inhibida por ATP y Acil-CoA de cadena larga; y su producto (citrato) inhibe la acción de la PFK, lo cual indica su estrecha relación con el metabolismo de ácidos grasos y la glucolisis. Debido a lo anterior, se sugiere el hecho de que probablemente se están forzando las condiciones de mantenimiento del balance

energético de la célula para contrarrestar el efecto del estrés, incluso después de la exposición, ya que se observa esta misma respuesta a las 12 h.

En el caso de los genes relacionados al metabolismo de nucleótidos, se observó un incremento en la expresión de los genes codificantes de las enzimas RPB4 y XDH. En el caso de la RPB4, se observa incremento de expresión durante (3 y 5 h) y después de la exposición a hipoxia (12 h). Estos resultados nos indican que se están restaurando los procesos afectados durante y después de que ocurre la condición estresante; esto probablemente sea así, ya que durante la hipoxia procesos de mantenimiento celular se ven afectados por la reducción en el uso de oxígeno (Ulaje-Fernandez, 2015). En el caso de la expresión de XDH, se observó aumento al inicio y pasado el periodo de exposición a hipoxia confirmando la teoría mencionada en el reto de hipertermia, donde al parecer la célula tiene la capacidad de activar y desactivar esta enzima de forma postraduccional y la regulación de la expresión se involucra más en preparación y reparación de la célula ante estrés.

Los camarones responden a la hipoxia aumentando la expresión de los genes HIF y glucólisis anaerobia para mantener la homoeostasis energética. Como se mencionó anteriormente, la enzima PFK (clave en la regulación de la glucólisis) aumenta su actividad para hacer frente a la demanda de degradación de glucosa y acelerar la producción de ATP; sin embargo, también se observó un aumento en la expresión de LDH en sus dos isoformas (1 y 2); particularmente esta enzima, es considerada el principal indicador en el cambio de glucólisis aeróbica a la anaeróbica al realizar la reacción de conversión del piruvato en lactato, evitando la formación de acetil-CoA para su degradación en el ciclo de Krebs, con lo que se confirma la activación de la glucólisis anaeróbica bajo estas condiciones. Además de lo anterior, se observó una relación directa entre la sobre-expresión de los

genes anteriores (PFK, LDH1, LDH2) y las subunidades de HIF-1 (α, β), concordando con respuestas similares de expresión en los genes LDH y hexoquinasa en branquias, encontradas para *L. vannamei* en respuesta a condiciones de hipoxia; por lo cual, en este trabajo también se puede atribuir al factor de transcripción HIF-1, la función como regulador en la activación de genes relacionados con el metabolismo anaeróbico para mantener el estado de homeostasis celular y principal respuesta metabólica para contrarrestar la disminución de oxígeno (Cota-Ruiz *et al*., 2015, 2016; Soñanez-Organis *et al*., 2010; Soñanez-Organis *et al*., 2012).

El objetivo del análisis factorial es revelar cualquier variable latente que provoque que otras variables co-varíen, generando agrupaciones estadísticamente significativas. En este sentido, se observaron tres grupos generados con este análisis (Fig. 16), el primero de ellos (esquina superior derecha), reflejó las variables que tienen una correlación con el uso de metabolismo aeróbico, es decir, la correlación entre la expresión génica del metabolismo oxidativo (CS, SDHA), el uso de carbohidratos (contenido de carbohidratos en el músculo, hepatopáncreas y branquias) y la movilización de carbohidratos entre los tejidos (contenido de glucosa y lactato en hemolinfa). La segunda construcción (esquina inferior izquierda) representa la agrupación de variables relacionadas con la activación de la glucólisis anaeróbica a través de la expresión génica (HIF-1, PFK, LDH). Por último, hay una tercera construcción (esquina inferior derecha) donde el contenido de GCG muscular aparece por separado, probablemente relacionado con el almacenamiento de carbohidratos. De acuerdo con esto, se puede concluir que es muy probable que las modificaciones en el contenido de carbohidratos se relacionen con la expresión de genes del ciclo de Krebs debido a su relación con el metabolismo oxidativo; y además, se vuelve a fortalecer la clara relación existente entre la expresión génica de la glucólisis anaeróbica y la regulación mediada por HIF-1.

El metabolismo de los carbohidratos junto con la respuesta a nivel de expresión en diferentes tejidos integra la estrategia de energía utilizada por los camarones para contrarrestar el estrés por hipoxia. Después de realizar una revisión bibliográfica acerca de las respuestas encontradas en *L. vannamei* bajo condiciones similares de hipoxia, fue posible observar la integración de respuestas relacionadas con movilización de carbohidratos en diferentes tejidos, la disminución de lactato y el aumento de la expresión génica de la glucólisis anaeróbica. En este sentido, se identificó que la vía que une la glucólisis anaeróbica y la gluconeogénesis de diferentes tejidos se conoce como el ciclo de Cori, los resultados sobre el aumento de carbohidratos en las branquias, músculo y la hemolinfa, y el aumento de las transcripciones de PFK y LDH en las branquias registradas en este trabajo junto con la acumulación de lactato y una mayor actividad de las enzimas PFK y FBP en el hepatopáncreas después de la exposición a corto plazo a la hipoxia informada por Cota-Ruiz en años recientes, apoyan la activación de esta vía en *L. vannamei* bajo condiciones de hipoxia. En la Fig. 27 se muestra la integración de estos resultados, donde se ilustra cómo la hipoxia induce la acumulación de lactato en el músculo y las branquias vía glucólisis anaeróbica (PFK, LDH), molécula que después es transportada por la hemolinfa al hepatopáncreas, donde se usa como sustrato en la gluconeogénesis (PEPCK, FBP); la cual, probablemente es catabolizada (PFK) en el mismo hepatopáncreas para satisfacer las altas necesidades energéticas, o para repetir el ciclo regresa vía hemolinfa a otros tejidos (branquias, músculo), para volver a ser utilizada en el metabolismo de carbohidratos.

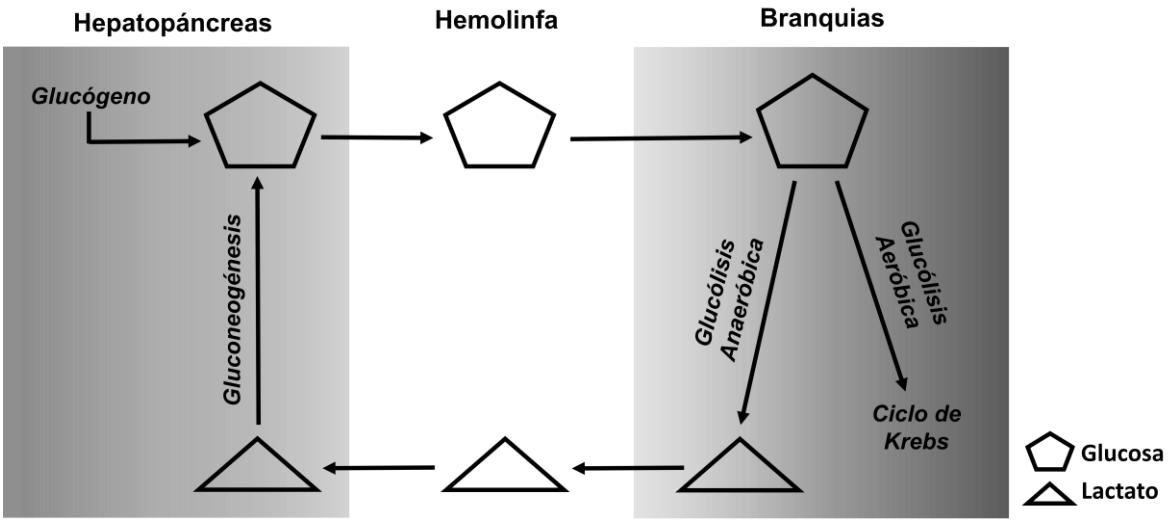

Figura 27. Red del metabolismo de carbohidratos (similar ciclo de Cori) entre diferentes tejidos de *L. vannamei* bajo estrés por hipoxia a corto plazo.

8.2.3. Respuesta crónica

Además del tipo de estrés, evaluar la recurrencia de estas condiciones es importante ya que se ha documentado que las respuestas al estrés pueden variar a largo plazo. Las actividades metabólicas de los poiquilotermos acuáticos, incluidos los crustáceos, dependen en gran medida de las condiciones ambientales, siendo la temperatura y el oxígeno disuelto dos de los principales factores que afectan su metabolismo; sin embargo, cuando estas condiciones se prolongan, la respuesta puede mantenerse, aumentar o cambiar dependiendo de la duración e intensidad del evento estresante. Aunque la aclimatación a hipoxia o temperatura puede mejorar el rendimiento a las condiciones de aclimatación, también puede causar una disminución en el rendimiento a condiciones que no eran estresantes antes de la aclimatación (por ejemplo, una disminución de la capacidad aeróbica a altas temperaturas después de aclimatación a baja temperatura) (Chung y Schulte, 2015). Cambios como estos representan un "costo de aclimatación", e identificar los mecanismos relacionados con estas respuestas, puede proporcionar información sobre los factores que influyen en la tolerancia de

los organismos. En este sentido, este trabajo se enfocó en cuantificar la expresión de genes relacionados con el ciclo de Krebs y el metabolismo de carbohidratos, lípidos y aminoácidos en *L. vannamei*, y observar ¿cuál es el efecto de la recurrencia de hipertermia e hipoxia en el corto y largo plazo en estos mecanismos?

L. vannamei responde a estrés por hipertermia e hipoxia a largo plazo mediante la expresión de genes relacionados al almacenamiento de carbohidratos. En la expresión de genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos (PFK, TPI, PEPCK), se observó la sub expresión de todos para el día 5; sin embargo, cuando la exposición a estas variables se prolongó, los organismos aumentaron la expresión de los genes relacionados con almacenamiento de carbohidratos (TPI, PEPCK). La estrategia utilizada por los camarones durante este reto, nos indica que para mantener la demanda de glucosa durante condiciones de alta demanda energética, probablemente se hizo uso de la gluconeogénesis para producir glucosa de novo a partir de otros metabolitos, como lactato, piruvato, glicerol y aminoácidos. Una enzima clave para este proceso es la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK; GTP, EC 4.1.1.32). PEPCK cataliza la formación reversible de fosfoenolipiruvato (PEP) a partir de oxaloacetato (OAA) y GTP. En eucariotas se conocen dos isoformas de PEPCK, una mitocondrial (PEPCK-M) y una citosólica (PEPCK-C) (Nordlie y Lardy, 1963). Aunque actualmente hay pocos estudios detallados sobre la gluconeogénesis y las enzimas involucradas en este proceso en crustáceos, se ha observado que el tejido de hepatopancreas es el sitio principal para la gluconeogénesis en los crustáceos decápodos (Hervant *et al*., 1999; Vinagre y Da Silva, 2002), aunque algunos estudios también observaron este proceso en branquias (Chittó *et al*., 2001) y músculo (Schein *et al*., 2004). En nuestro estudio el gen que codifica la enzima de PEPCK-C, aumentó su expresión en branquias el día 24 en condiciones de hipertermia y del día 5 al 24 en hipoxia, por lo cual, se puede inferir el uso de glucosa para mantener la alta demanda

energética, resultado comparable con estudios anteriores en metabolitos, donde también se observó un aumento de carbohidratos en el tejido de branquias debido a la exposición a hipertermia e hipoxia. Otro de los genes involucrados en esta respuesta es el codificante para la triosa fosfato isomerasa (TPI), ya que la función de esta enzima es ajustar el equilibrio entre el fosfato de dihidroxiacetona y el gliceraldehído-3-fosfato, aunque en este caso no es claro debido a que esta enzima también puede ser utilizada tanto en la degradación como en la formación de glucosa.

Los patrones de expresión de genes relacionados con degradación de lípidos, indican una disminución en la degradación de estos compuestos en branquia, principalmente en el corto plazo (día 5). Los ácidos grasos (FA), proporcionados por la absorción exógena de FA o la síntesis de novo, se utilizan como sustratos para la oxidación y la producción de energía, síntesis de membrana, almacenamiento de energía en forma de triacilgliceroles (TAG) y la producción de moléculas de señalización y, por lo tanto, son esenciales para la supervivencia celular y proliferación bajo condiciones de estrés. Como se mencionó anteriormente, las enzimas Acil-CoA sintetasa (ACS) y la enzima carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT1), se encargan de la activación de los ácidos grasos almacenados en los tejidos para su degradación mediante la β-oxidación. En los resultados obtenidos en este estudio, hay una clara diminución de ambos genes para el día dos durante hipoxia y el día 5 para hipertermia, lo cual sugiere, que en la respuesta relacionada con la degradación de lípidos, se ve afectada en el corto plazo. En el caso de hipertermia, no observar cambios en los genes relacionados con la degradación de ácidos grasos, probablemente se deba a que están haciendo uso de estos compuestos para fortalecer otros mecanismos de respuesta, ya que existen evidencias de que los esfingolípidos tienen una función de señalización en la producción de HSP durante la exposición a altas temperaturas (Balogh *et al*., 2013). Respuestas similares en condiciones de

hipoxia, han sido observadas en hepatocitos y células de carcinoma renal, donde la acumulación de lípidos ocurre por la inhibición de enzimas involucradas en la degradación de ácidos grasos, particularmente PGC-1α y CPT1, mediante una regulación negativa dependiente de HIF-1 y HIF-2 (Liu *et al*., 2014; Mylonis *et al*., 2012; Mylonis *et al*., 2019).

Los camarones en el corto plazo tienden a disminuir su expresión de genes del ciclo de Krebs, aparentemente por una disminución general de expresión, sin embargo; restablecen la expresión de estos genes durante la exposición a hipertermia e hipoxia recurrente en el largo plazo. En este trabajo encontramos que la expresión de genes relacionados con enzimas del ciclo de Krebs (CS, SDHA) se sub-expresan durante la exposición a hipoxia en el día 2, sugiriendo que la actividad tanto del ciclo de Krebs como de la fosforilación oxidativa disminuye para hacer frente a la disminución en el oxígeno ambiental. Esta respuesta a corto plazo, probablemente fue influenciada por los periodos previos de hipertermia, ya que no había sido observada durante la exposición aguda a hipoxia; sin embargo, la expresión del gen SDHA en el largo plazo, primero se reestablece (día 14) y después aumenta (día 24) en condiciones de hipoxia, lo cual indica, la importancia de esta enzima en condiciones de bajo oxígeno. En este sentido, la sobre-expresión de transcritos de SDHA durante la exposición a hipoxia, pueden indicar una mejor distribución de oxígeno en las branquias, ya que se ha encontrado que la acumulación de succinato como resultado de una disminución en la actividad de la enzima SDH conduce a la estabilización de HIF1α, regulando una serie de genes implicados en la distribución de oxígeno en tejidos que aseguran la resistencia celular durante periodos de hipoxia (Briere et al., 2006; Selak et al., 2005; Benit et al., 2014); sin embargo, esto fue deducido en cultivos celulares, por lo cual, se necesitan más estudios para corroborar este mecanismo en camarones.

Los genes relacionados con el metabolismo de aminoácidos, mostraron diferentes patrones de expresión en el corto plazo y largo plazo durante la exposición a hipertermia, probablemente relacionados con diferentes estrategias de obtención de energía. Los genes FAH, PCCB y SCOT, se encuentran relacionados con la degradación de aminoácidos esenciales para su uso como sustratos energéticos en el ciclo de Krebs. En los resultados obtenidos para la exposición a hipertermia, la disminución en el corto plazo (día 5) de estos genes y aquellos relacionados con el ciclo de Krebs, nos indican que probablemente *L. vannamei* deja de obtener energía a partir de aminoácidos libres, debido al estrés al que se encuentra sometido; sin embargo, para el largo plazo el tejido se ve forzado a reestablecer el uso de estos compuestos (día 14); e inclusive, aumentarlo (día 24), probablemente para solventar el aumento del metabolismo provocado por la alta temperatura, aunque esta respuesta no es tan clara debido a que no se observó un aumento en genes del ciclo de Krebs.

Los camarones utilizan aumento su expresión del gen codificante para arginina quinasa, como estrategia de obtención de energía cuando el estrés se prolonga. La arginina quinasa (AK) en invertebrados y las creatina quinasas en vertebrados juegan un papel importante en el metabolismo energético al funcionar como donadoras de fosfágenos para la obtención de ATP en el citosol y existe evidencia de que AK participa en la respuesta a condiciones ambientales adversas. En las branquias de *Callinectes sapidus*, la aclimatación a la salinidad no tuvo impacto en las actividades de AK, pero la exposición a baja salinidad resultó en un aumento de expresión de 1.7 veces (Holt y Kinsey 2002), en *Penaeus monodon*, se detectó una mayor actividad de AK en diferentes tejidos después de la exposición a baja salinidad (Shekhar *et al*., 2013), y para *Apis cerana* AK se sobre-expresó bajo condiciones estresantes, incluyendo exposición a metales pesados, pesticidas, herbicidas, oxidantes antioxidantes, hipotermia e hipertermia (Chen, 2015). En nuestro estudio, el gen codificante para AK, se sobre-expresó el día 24 durante

exposición a hipertermia y los días 14 y 24 durante hipoxia; por lo cual, tomando en cuenta nuestros resultados y los reportados, la acción de AK como fuente alternativa de producción de ATP usando arginina fosfato, es de gran importancia no solo durante periodos de ejercicio en tejidos musculares, sino también en la respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico para mantener el balance energético de la célula.

En relación a la expresión génica global, los camarones modificaron la expresión de genes de las vías metabólicas de forma similar a la expresión del factor de transcripción HIF-1. El Factor Inducible por Hipoxia 1 (HIF, por sus siglas en inglés), es un heterodímero compuesto por dos subunidades (α y β), al cual se le ha relacionado principalmente con regular la acción del metabolismo anaeróbico activando o desactivando genes relacionados con la síntesis de transportadores de oxígeno, transportadores de glucosa y vías glucolíticas (Gorr, *et al*., 2010; Schito & Rey, 2017; Semenza, 2012; José G. Soñanez-Organis *et al.,* 2009), y también lo relacionan con la regulación del metabolismo de lípidos (Liu *et al*., 2014; Mylonis et al., 2019). En los resultados obtenidos, se observó que la expresión de las subunidades del gen HIF-1, pueden tener un alto impacto sobre la expresión general de los demás genes del metabolismo; y además, se observó que cada subunidad regula de forma diferente los patrones de estas respuestas. En el día 2 para hipoxia y 5 para hipertermia, cuando el gen HIF-1β se sub-expresa, se observó una disminución en la expresión en más 50% de los genes cuantificados; por otro lado, cuando el gen HIF-1α se sobre-expresa, en el día 24 tanto para condiciones de hipertermia como hipoxia sucede lo mismo con la expresión de los demás genes, observando un aumento de más del 50% de los genes cuantificados. Lo anterior es relevante, si sabemos que para este factor de transcripción la subunidad β es considerada constitutiva y la subunidad α responsable de la respuesta al estrés.

Las variaciones en la expresión génica de HSP70 y HSP90 en las branquias de camarones mostraron una relación positiva con la temperatura y los niveles de OD bajo fluctuaciones diarias cíclicas. Se ha demostrado que el ARNm de HSP aumenta cuando se expone a condiciones de hipertermia, y esta respuesta representa una de las principales estrategias de termotolerancia asociadas con la tolerancia al estrés por calor de los camarones (Sung *et al*., 2018; Zhou *et al*., 2010a; Zhou *et al*., 2010b). También observamos una subexpresión de HSP70 y HSP90 durante la hipoxia, en contraste con las observaciones de estudios previos en los que se induce la síntesis de HSP cuando la concentración de oxígeno ambiental disminuye (Li, *et al.*, 2009); sin embargo, la disminución en la síntesis de ARNm de HSP cuando disminuye el OD ambiental se ha atribuido al daño mitocondrial y una respuesta lenta de los camarones a las condiciones hipóxicas (Huang *et al*., 2011; Li *et al*., 2009) dadas nuestras condiciones experimentales oscilantes, nuestros resultados no son directamente comparables, pero se puede explicar si se considera que la actividad inducida por HSPs provocada por la hipertermia en camarones aparentemente puede persistir durante al menos 3 días debido a una acumulación en la concentración de HSPs en la célula (Clegg *et al*., 2000), por lo que en nuestro diseño experimental, esta citoprotección celular extendida podría compensar las necesidades de HSP para superar la hipoxia y combinarse con la disminución general en la transcripción y síntesis de proteínas como respuesta general a la hipoxia en los crustáceos (McMahon, 2000; Wu, 2002) dando como resultado una regulación negativa de estos genes. Sin embargo, se necesita más evidencia para explicar tales mecanismos complejos de regulación de la transcripción y síntesis de HSP durante variaciones de hipertermia e hipoxia en *L. vannamei*.

En la respuesta global de expresión de genes de diferentes rutas metabólicas, los diferentes patrones de expresión encontrados, probablemente reflejan la estrategia adaptativa de la especie para soportar el estrés por hipertermia e hipoxia a largo plazo. En el presente trabajo, al analizar los resultados tomando la expresión de todos los genes analizados como una respuesta global de expresión génica, fue posible observar diferentes patrones relacionados con el uso de energía conforme pasó el tiempo de exposición (Fig. 26). En este sentido, se identificó que en el corto plazo se regula negativamente la expresión de la mayoría de los genes (≥50% genes sub-expresados hipoxia día 2, hipertermia día 5); a los 14 días, la expresión global (>50%) regresa a valores similares a los encontrados en los organismos antes de la exposición al estrés, y en el largo plazo se regula positivamente la expresión (≥50% genes sobre-expresados). Resultados similares donde existen diferentes patrones de expresión relacionados con la duración del estrés por hipoxia han sido reportados anteriormente por el grupo de investigación del Departamento de Ciencias Costeras, en la Universidad del Sur de Mississippi (Brown-Peterson *et al*., 2005, 2008, 2011; Li y Brouwer, 2009), con cambios en la expresión de genes relacionados con HSPs y el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, observando que existe un patrón general de regulación negativa de la expresión génica (sub-expresión) dentro de los primeros 5 a 10 días y el regreso a valores basales o sobre-expresión de los mismos genes pasados los 14 días de exposición a hipoxia. El grupo mencionado atribuyen la primera respuesta a una disminución a corto plazo en la síntesis de proteínas y lo definen como un perfil "característico" del camarón expuesto en laboratorio a ciclos diarios de hipoxia.

Además de lo mencionado arriba, generalmente los cambios inducidos por causa del medio ambiente provocan una interrupción en la estequiometría u homeostasis de la fisiología en su conjunto y se considera que la regulación en las tasas fisiológicas es una respuesta del organismo para igualar el flujo entre rutas

bioquímicas interconectadas; por lo tanto, las restricciones y/o modificaciones metabólicas pueden reflejar la adaptación genética de la especie y explicar porque las principales respuestas a variaciones climáticas a largo plazo son aquellas relacionadas con la aclimatación (Seebacher *et al.*, 2015). Teniendo esto en cuenta, nosotros suponemos que los cambios globales de expresión encontrados en este trabajo, pueden estar describiendo patrones involucrados en el uso de energía y mecanismos de compensación - adaptación fisiológica de la especie en relación a la recurrencia o tiempo de exposición a las condiciones estresantes manejadas en este estudio, sin embargo, hace falta más evidencias para poder explicar y corroborar esta hipótesis.

9. CONCLUSIONES

El grado de hipoxia utilizado en este estudio (2 mgO_2/L) disminuyó la tolerancia térmica de PL de *L. vannamei*, en temperaturas de 36 a 39 °C, sin afectar su tolerancia por arriba o debajo de estas temperaturas.

Durante la exposición aguda a hipertermia, se observó un aumento en la expresión de genes del ciclo de Krebs (CS) durante y una vez pasado el estrés, relacionado con el aumento del metabolismo el primero y con la obtención de energía para el proceso de recuperación de los organismos el segundo.

Durante del reto agudo de hipoxia, se observaron cambios en la expresión de genes relacionados con la obtención de energía, sugiriendo que una respuesta evolutiva importante de *L. vannamei* es la utilización de rutas metabólicas de ciclo de Krebs y metabolismo de lípidos junto con la glucólisis anaerobia para contrarrestar el efecto de la hipoxia.

En *L. vannamei*, durante oscilaciones cíclicas y alternadas de estrés térmico e hipoxia, observamos que dependiendo de la duración del estrés, existen diferentes patrones de expresión génica global, que probablemente se relacionan con cambios en el uso de energía y mecanismos de compensación/adaptación fisiológica de la especie.

Se recomienda que las granjas camaroneras mantengan temperaturas inferiores a 34 °C durante condiciones hipóxicas y concentraciones superiores a 2 mgO_2/L durante eventos extremos de hipertermia en los estanques para mantener un desempeño y crecimiento óptimo de los organismos y disminuir efectos de estrés que podrían contribuir a disminuir el rendimiento de los cultivos.

10. LITERATURA CITADA

Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Ørntoft, T. F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. Cancer Research. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496

Aparicio-Simón, B., Piñón, M., Racotta, R., & Racotta, I. S. (2010). Neuroendocrine and metabolic responses of Pacific whiteleg shrimp Litopenaeus vannamei exposed to acute handling stress. Aquaculture, 298(3–4), 308–314. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.10.016

Baden, S., Pihl, L., & Rosenberg, R. (1990). Effects of oxygen depletion on the ecology, blood physiology and fishery of the Norway lobster Nephrops norvegicus. Marine Ecology Progress Series, 67(October), 141–155. https://doi.org/10.3354/meps067141

Baird, N. A., Turnbull, D. W., & Johnson, E. A. (2006). Induction of the heat shock pathway during hypoxia requires regulation of heat shock factor by hypoxia-inducible factor-1. Journal of Biological Chemistry, 281(50), 38675–38681. https://doi.org/10.1074/jbc.M608013200

Balogh, G., Péter, M., Glatz, A., Gombos, I., Török, Z., Horváth, I., Vígh, L. (2013). Key role of lipids in heat stress management. FEBS Letters, 587(13), 1970–1980. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.016

Beitinger, T.L., Fitzpatrick, L.C. 1979. Physiological and ecological correlates of preferred temperature in fish. Am. Zool. 19, 319–330.

Bénit, P., Letouzé, E., Rak, M., Aubry, L., Burnichon, N., Favier, J., Rustin, P. (2014). Unsuspected task for an old team: Succinate, fumarate and other Krebs cycle acids in metabolic remodeling. Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics, 1837(8), 1330–1337. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2014.03.013

Boutilier, R. G., & St-Pierre, J. (2000). Surviving hypoxia without really dying. Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology, 126(4), 481–490. https://doi.org/10.1016/S1095-6433(00)00234-8

Breitburg, D., Levin, L. A., Oschlies, A., Grégoire, M., Chavez, F. P., Conley, D. J., Zhang, J. (2018). Declining oxygen in the global ocean and coastal waters. Science, 359(6371). https://doi.org/10.1126/science.aam7240

Briere, J.-J., Favier, J., Gimenez-Roqueplo, A.-P., & Rustin, P. (2006). Tricarboxylic acid cycle dysfunction as a cause of human diseases and tumor formation. AJP: Cell Physiology, 291(6), C1114–C1120. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00216.2006

Brouwer, M., Brown-Peterson, N. J., Larkin, P., Patel, V., Denslow, N., Manning, S., & Brouwer, T. H. (2007). Molecular and whole animal responses of grass shrimp, Palaemonetes pugio, exposed to chronic hypoxia. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 341(1), 16–31. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.10.049

Brown-Peterson, N. J., Larkin, P., Denslow, N., King, C., Manning, S., & Brouwer, M. (2005). Molecular indicators of hypoxia in the blue crab Callinectes sapidus. Marine Ecology Progress Series, 286(June 2014), 203–215. https://doi.org/10.3354/meps286203

Brown-Peterson, N. J., Manning, C. S., Denslow, N. D., & Brouwer, M. (2011). Impacts of cyclic hypoxia on reproductive and gene expression patterns in the grass shrimp: Field versus laboratory comparison. Aquatic Sciences, 73(1), 127–141. https://doi.org/10.1007/s00027-010-0166-3

Brown-Peterson, N. J., Manning, C. S., Patel, V., Denslow, N. D., & Brouwer, M. (2008). Effects of cyclic hypoxia on gene expression and reproduction in a grass shrimp, Palaemonetes pugio. Biological Bulletin, 214(1), 6–16. https://doi.org/10.2307/25066655

Brown, P. O., & Botstein, D. (1999). Exploring the new world of the genome with dna microarrays. Nature Genetics, 21(1S), 37. https://doi.org/10.1038/4462

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical Chemistry. 55, 611-622.

Carreño-Mejía, Atzín. 2009. Influencia del estrés por hipertermia a corto plazo sobre índices fisiológicos, inmunológicos y celulares en camarón blanco Litopenaeus vannamei. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

Cao, Y., Traer, E., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., & Prescott, S. M. (1998). Cloning, expression, and chromosomal localization of human long-chain fatty acid-CoA ligase 4 (FACL4). Genomics, 49(2), 327–330. https://doi.org/10.1006/geno.1998.5268

Chen, J. C., & Lai, S. H. (1993). Effects of temperature and salinity on oxygen consumption and ammonia-N excretion of juvenile Penaeus japonicus Bate. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 165(2), 161–170. https://doi.org/10.1016/0022-0981(93)90103-U

Chen, X., Yao, P., Chu, X., Hao, L., Guo, X., & Xu, B. (2015). Isolation of arginine kinase from Apis cerana cerana and its possible involvement in response to adverse stress. Cell Stress and Chaperones, 20(1), 169–183. https://doi.org/10.1007/s12192-014-0535-2

Cheng, W., Liu, C. H., & Kuo, C. M. (2003). Effects of dissolved oxygen on hemolymph parameters of freshwater giant prawn, Macrobrachium rosenbergii (de Man). Aquaculture, 220(1–4), 843–856. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00534-3

Cheng, W., Wang, L. U., & Chen, J. C. (2005). Effect of water temperature on the immune response of white shrimp Litopenaeus vannamei to Vibrio alginolyticus. Aquaculture, 250(3–4), 592–601. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.060

Chittó, A.L., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M., 2001. Atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e o efeito do ácido picolínico sobre a gliconeogenese em branquias de caranguejo Chasmagnathus granulata. In: XVI Reuniao Anual da Federacao de Sociedades de Biologia Experimental. 416.

Choder, M., & Young, R. A. (1993). A portion of RNA polymerase II molecules has a component essential for stress responses and stress survival. Molecular and Cellular Biology, 13(11), 6984–6991. https://doi.org/10.1128/mcb.13.11.6984

Chung, D. J., & Schulte, P. M. (2015). Mechanisms and costs of mitochondrial thermal acclimation in a eurythermal killifish (Fundulus heteroclitus). Journal of Experimental Biology, 218(11), 1621–1631. https://doi.org/10.1242/jeb.120444

Clegg, J. S., Jackson, S. A., Van Hoa, N., & Sorgeloos, P. (2000). Thermal resistance, developmental rate and heat shock proteins in Artemia franciscana, from San Francisco Bay and southern Vietnam. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 252(1), 85–96. https://doi.org/10.1016/S0022-0981(00)00239-2

Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., Talón, M., Robles, M., 2005. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. Bioinformatics. 21, 3674-3676.

Cota-Ruiz, K., Leyva-Carrillo, L., Peregrino-Uriarte, A. B., Valenzuela-Soto, E. M., Gollas-Galván, T., Gómez-Jiménez, S., Yepiz-Plascencia, G. (2016). Role of HIF-1 on phosphofructokinase and fructose 1, 6-bisphosphatase expression during hypoxia in the white shrimp Litopenaeus vannamei. Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology, 198, 1–7. 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. Marine Environmental Research, 106(1), 1–9. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.02.003

De La Vega, E., Hall, M. R., Degnan, B. M., & Wilson, K. J. (2006). Short-term hyperthermic treatment of Penaeus monodon increases expression of heat shock protein 70 (HSP70) and reduces replication of gill associated virus (GAV). Aquaculture, 253(1–4), 82–90. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.041

de la Vega, E., Hall, M. R., Wilson, K. J., Reverter, A., Woods, R. G., & Degnan, B. M. (2007). Stress-induced gene expression profiling in the black tiger shrimp Penaeus monodon. Physiol Genomics, 31, 126–138. https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00068.2007.

Diana, J.S. 1983. Oxygen consumption by large mouth bass under constant and fluctuating thermal regimes. Can. J. Zool. 61, 1892–1895.Das, T., & Stickle, W. B. (1993). Sensitivity of crabs Callinectes sapidus and C. similis and the gastropod Stramonita

haemastoma to hypoxia and anoxia. Marine Ecology Progress Series, 98(3), 263–274. https://doi.org/10.3354/meps098263

Díaz, F., Re, A. D., Sánchez, A., Cruz, H., González, R. A., Sánchez, L. N., … Rosas, C. (2013). The effects of exposure to critical thermal maxima on the physiological, metabolic, and immunological responses in adult white shrimp Litopenaeus vannamei (Boone). Marine and Freshwater Behaviour and Physiology, 45(6), 365–374. https://doi.org/10.1080/10236244.2013.771911

Dieffenbach, C. W., Dveksler, G, S. 2003 PCR Primer: A Laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Dupont-Prinet, A., Pillet, M., Chabot, D., Hansen, T., Tremblay, R., & Audet, C. (2013). Northern shrimp (Pandalus borealis) oxygen consumption and metabolic enzyme activities are severely constrained by hypoxia in the Estuary and Gulf of St. Lawrence. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 448, 298–307. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.07.019

Gess, B., Hofbauer, K. H., Deutzmann, R., & Kurtz, A. (2004). Hypoxia up-regulates triosephosphate isomerase expression via a HIF-dependent pathway. Pflugers Archiv European Journal of Physiology, 448(2), 175–180. https://doi.org/10.1007/s00424-004-1241-1

FAO. 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Ghaffari, N., Sanchez-Flores, A., Doan, R., Garcia-Orozco, K. D., Chen, P. L., Ochoa-Leyva, A., … Criscitiello, M. F. (2014). Novel transcriptome assembly and improved annotation of the whiteleg shrimp (Litopenaeus vannamei), a dominant crustacean in global seafood mariculture. Scientific Reports, 4, 1–10. https://doi.org/10.1038/srep07081

Giattina, J.R., Garton, R.R. 1982. Graphical model of thermoregulatory behavior by fishes with a new measure of eurythermality. Can. J. Aquat. Sci. 39, 524–528.

González, R. A., Díaz, F., Licea, A., Re, A. D., Noemí Sánchez, L., & García-Esquivel, Z. (2010). Thermal preference, tolerance and oxygen consumption of adult white shrimp

Litopenaeus vannamei (Boone) exposed to different acclimation temperatures. Journal of Thermal Biology, 35(5), 218–224. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2010.05.004

Gorr, T. A., Wichmann, D., Hu, J., Hermes-Lima, M., Welker, A. F., Terwilliger, N., Gassmann, M. (2010). Hypoxia tolerance in animals: Biology and application. Physiological and Biochemical Zoology, 83(5), 733–752. https://doi.org/10.1086/648581

Grad, I., & Picard, D. (2007). The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. Molecular and Cellular Endocrinology, 275(1–2), 2–12. https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.05.018

Hall, M. R., & van Ham, E. H. (1998). The Effects of Different Types of Stress on Blood Glucose in the Giant Tiger Prawn Penaeus monodon. Journal of the World Aquaculture Society, 29(3), 290–299. https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1998.tb00649.x

Herrera, F. D., Uribe, E. S., Ramirez, L. F. B., & Mora, A. G. (1998). Critical thermal maxima and minima of Macrobrachium rosenbergii (Decapoda: Palaemonidae). Journal of Thermal Biology, 23(6), 381–385. https://doi.org/10.1016/S0306-4565(98)00029-1

Hervant, F., Garin, D., Mathieu, J., & Freminet, A. (1999). Lactate metabolism and glucose turnover in the subterranean crustacean niphargus virei during post-hypoxic recovery. The Journal of Experimental Biology, 202(5), 579 LP – 592. Retrieved from http://jeb.biologists.org/content/202/5/579.abstract

Hochachka, P. W., & Somero, G. N. (2014). Biochemical adaptation. Biochemical Adaptation. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-395521-0.50011-7

Holt, S. M., & Kinsey, S. T. (2002). Osmotic effects on arginine kinase function in living muscle of the blue crab Callinectes sapidus. Journal of Experimental Biology, 205(12), 1775–1785.

Horváth, I., Multhoff, G., Sonnleitner, A., & Vígh, L. (2008). Membrane-associated stress proteins: More than simply chaperones. Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, 1778(7–8), 1653–1664. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.02.012

Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nature Protocols, 4(1), 44–57. https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211

Huang, S., & Millar, A. H. (2013). Succinate dehydrogenase : the complex roles of a simple enzyme. Current Opinion in Plant Biology, 16(3), 344–349. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.02.007

Huang, W. J., Leu, J. H., Tsau, M. T., Chen, J. C., & Chen, L. L. (2011). Differential expression of LvHSP60 in shrimp in response to environmental stress. Fish and Shellfish Immunology, 30(2), 576–582. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.12.001

Huggett, J. F., Foy, C. A., Benes, V., Emslie, K., Garson, J. A., Haynes, R., … Bustin, S. A. (2013). The digital MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments. Clinical Chemistry, 59(6), 892–902. https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.206375

Jiang, H., Li, F., Xie, Y., Huang, B., Zhang, J., Zhang, J., … Xiang, J. (2009). Comparative proteomic profiles of the hepatopancreas in Fenneropenaeus chinensis response to hypoxic stress. Proteomics, 9(12), 3353–3367. https://doi.org/10.1002/pmic.200800518

Katschinski, D. M., Le, L., Schindler, S. G., Thomas, T., Voss, A. K., & Wenger, R. H. (2004). Interaction of the PAS B domain with HSP90 accelerates hypoxia-inducible factor-1α stabilization. Cellular Physiology and Biochemistry, 14(4–6), 351–360. https://doi.org/10.1159/000080345

Kayyali, U. S., Donaldson, C., Huang, H., Abdelnour, R., & Hassoun, P. M. (2001). Phosphorylation of Xanthine Dehydrogenase/Oxidase in Hypoxia. Journal of Biological Chemistry, 276(17), 14359–14365. https://doi.org/10.1074/jbc.M010100200

Kelsch, S.W. 1996. Temperature selection and performance by blue gills: evidence for selection in response to available power. Trans. Am. Fish. Soc. 112, 424–430.

Kumlu, M., Kumlu, M., & Turkmen, S. (2010). Combined effects of temperature and salinity on critical thermal minima of pacific white shrimp Litopenaeus vannamei (Crustacea:

Penaeidae). Journal of Thermal Biology, 35(6), 302–304. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2010.06.008

Li, F., Luan, W., Zhang, C., Zhang, J., Wang, B., Xie, Y., … Xiang, J. (2009). Cloning of cytoplasmic heat shock protein 90 (FcHSP90) from Fenneropenaeus chinensis and its expression response to heat shock and hypoxia. Cell Stress and Chaperones, 14(2), 161–172. https://doi.org/10.1007/s12192-008-0069-6

Li, T., & Brouwer, M. (2009). Gene expression profile of grass shrimp Palaemonetes pugio exposed to chronic hypoxia. Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics, 4(3), 196–208. https://doi.org/10.1016/j.cbd.2009.03.004

Liao, I. C., & Chien, Y. (2011). In the Wrong Place - Alien Marine Crustaceans: Distribution, Biology and Impacts. In the Wrong Place - Alien Marine Crustaceans: Distribution, Biology and Impacts. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0591-3

Liu, Y., Ma, Z., Zhao, C., Wang, Y., Wu, G., Xiao, J., … Feng, W. (2014). HIF-1α and HIF-2α are critically involved in hypoxia-induced lipid accumulation in hepatocytes through reducing PGC-1α-mediated fatty acid β-oxidation. Toxicology Letters, 226(2), 117–123. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.01.033

Llanso, R. J., & Diaz, R. J. (1994). Tolerance to low dissolved oxygen by the tubicolous polychaete loimia medusa. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 74(1), 143–148. https://doi.org/10.1017/S0025315400035724

Logan, C. A., & Somero, G. N. (2010). Transcriptional responses to thermal acclimation in the eurythermal fish Gillichthys mirabilis (Cooper 1864). American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 299(3), 843–852. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00306.2010

Lucien-Brun, H. 1989. Guía para la producción de camarón en el Ecuador. 1a. Edición. 58 pp.

Marie, B., Genard, B., Rees, J. F., & Zal, F. (2006). Effect of ambient oxygen concentration on activities of enzymatic antioxidant defences and aerobic metabolism in the hydrothermal vent worm, Paralvinella grasslei. Marine Biology, 150(2), 273–284. https://doi.org/10.1007/s00227-006-0338-9

Martínez-Córdova L., Villareal, C.H. & Cortés J.E. 1999. Capitulo 1: Biología del camarón. Cultivo de camarones penéidos, principios y prácticas. AGT Editor S.A., México, D.F., 1-20.

Martinez-Palacios, C. A., Ross, L. G., & Jimenez-Valenzuela, L. (1996). The effects of temperature and body weight on the oxygen consumption of Penaeus vannamei, Boone, 1931. J. Aqua. Trop., 11(May 2017), 59–65.

McCauley, R.W., Casselman, J.M. 1981. The final preferendum as an index of optimum growth in fish. In: Proceeding of the World Symposium on Aquaculture Heated Effluents and Recirculation Systems. 11, 81-93.

McMahon, B. R. (2001). Respiratory and circulatory compensation to hypoxia in crustaceans. Respiration Physiology, 128(3), 349–364. https://doi.org/10.1016/S0034-5687(01)00311-5

MPEDA/NACA. 2003. Shrimp health management extension manual. Marine Products Export Development Authority (MPEDA), Cochin, India, 46 pp.

Mugnier, C., & Justou, C. (2004). Combined effect of external ammonia and molt stage on the blue shrimp Litopenaeus stylirostris physiological response. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 309(1), 35–46. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.03.008

Mugnier, C., & Soyez, C. (2005). Response of the blue shrimp Litopenaeus stylirostris to temperature decrease and hypoxia in relation to molt stage. Aquaculture, 244(1–4), 315–322. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.11.010

Mugnier, C., Zipper, E., Goarant, C., & Lemonnier, H. (2008). Combined effect of exposure to ammonia and hypoxia on the blue shrimp Litopenaeus stylirostris survival and physiological response in relation to molt stage. Aquaculture, 274(2–4), 398–407. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.033

Mylonis, I., Sembongi, H., Befani, C., Liakos, P., Siniossoglou, S., & Simos, G. (2012). Hypoxia causes triglyceride accumulation by HIF-1-mediated stimulation of lipin 1

expression. Journal of Cell Science, 125(14), 3485–3493. https://doi.org/10.1242/jcs.106682

Mylonis, I., Simos, G., & Paraskeva, E. (2019). Hypoxia-Inducible Factors and the Regulation of Lipid Metabolism. Cells, 8(3), 214. https://doi.org/10.3390/cells8030214

Nordlie, R.C., Lardy, H.A., 1963. Mammalian liver phosphoneolpyruvate carboxykinase activities. J. Biol. Chem. 238, 2259–2263.

Pallareti, L., Brown, A., & Thatje, S. (2018). Variability in hydrostatic pressure tolerance between Palaemon species: Implications for insights into the colonisation of the deep sea. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 503(December 2017), 66–71. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2018.02.011

Pascual, C., Sánchez, A., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., LeMoullac, G., & Rosas, C. (2003). Haemolymph metabolic variables and immune response in Litopenaeus setiferus adult males: The effect of an extreme temperature. Aquaculture, 218(1–4), 637–650. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00300-9

Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. Nucleic Acid Research. 29(9): 2002-2007.

Pérez-Rostro, C. I., Racotta, I. S., & Ibarra, A. M. (2004). Decreased genetic variation in metabolic variables of Litopenaeus vannamei shrimp after exposure to acute hypoxia. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 302(2), 189–200. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2003.10.010

Pillai, B. R., & Diwan, A. D. (2002). EFFECTS OF ACUTE SALINITY STRESS ON OXYGEN CONSUMPTION AND AMMONIA EXCRETION RATES OF THE MARINE SHRIMP with wide distribution in the Indo-Pacific re- gion is considered a candidate species for aquaculture . Although it is a smaller species odon (Fabrici, 22, 45–52.

Pillet, M., Dupont-Prinet, A., Chabot, D., Tremblay, R., & Audet, C. (2016). Effects of exposure to hypoxia on metabolic pathways in northern shrimp (Pandalus borealis) and Greenland halibut (Reinhardtius hippoglossoides). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 483, 88–96. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2016.07.002

Pockley, A. G., Muthana, M., & Calderwood, S. K. (2008). The dual immunoregulatory roles of stress proteins. Trends in Biochemical Sciences, 33(2), 71–79. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.10.005

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(1–2), 107–115. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00148-8

Pörtner, H. O. (2001). Climate change and temperature-dependent biogeography: Oxygen limitation of thermal tolerance in animals. Naturwissenschaften, 88(4), 137–146. https://doi.org/10.1007/s001140100216

Pörtner, H. O. (2002). Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: Systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology, 132(4), 739–761. https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00045-4

Pörtner, H. O. (2010). Oxygen- And capacity-limitation of thermal tolerance: A matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. Journal of Experimental Biology, 213(6), 881–893. https://doi.org/10.1242/jeb.037523

Pörtner, Hans O., Bock, C., & Mark, F. C. (2017). Oxygen- & capacity-limited thermal tolerance: Bridging ecology & physiology. Journal of Experimental Biology, 220(15), 2685–2696. https://doi.org/10.1242/jeb.134585

Prosser, L. 1991. Environmental and metabolic animal physiology, New York, Wiley-Liss.

Puente-Carreón, Eleonora. 2009. Respuestas fisiológicas de juveniles de camarón blanco Litopenaeus vannamei, a condiciones oscilantes de oxígeno disuelto y temperatura. Tesis de Doctorado. CICIMAR-IPN. 175 p.

Quinn, N. L., McGowan, C. R., Cooper, G. A., Koop, B. F., & Davidson, W. S. (2011). Ribosomal genes and heat shock proteins as putative markers for chronic, sublethal heat

stress in arctic charr: Applications for aquaculture and wild fish. Physiological Genomics, 43(18), 1056–1064. https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00090.2011

Racotta, I. S., & Palacios, E. (1998). Hemolymph Metabolic Variables in Response to Experimental Manipulation Stress and Serotonin Injection in Penaeus vannamei, 29(3), 1–6.

Racotta, Ilie S., Palacios, E., & Méndez, L. (2002). Metabolic responses to short and long-term exposure to hypoxia in white shrimp (Penaeus vannamei). Marine and Freshwater Behaviour and Physiology, 35(4), 269–275. https://doi.org/10.1080/1023624021000019333

Racotta, Ilie S, & Hernández-Herrera, R. (2000). Metabolic responses of the white shrimp, Penaeus vannamei, to ambient ammonia. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 125(4), 437–443. https://doi.org/10.1016/S1095-6433(00)00171-9

Ramírez, J., Chávez, L., Luis, J., & Guzmán, S. (2003). Microarreglos De Dna, XXVII (February), 97–120.

Randall D., Burggren W., French K., 1997, En: Fisiología Animal, Ed. McGraw-Hill Interamericana, 736-765.

Rathburn, C. K., Sharp, N. J., Ryan, J. C., Neely, M. G., Cook, M., Chapman, R. W., Burnett, K. G. (2013). Transcriptomic responses of juvenile pacific whiteleg shrimp, Litopenaeus vannamei, to hypoxia and hypercapnic hypoxia. Physiological Genomics, 45(17), 794–807. https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00043.2013

Re, A.D., Díaz, F. Sierra, E., Gómez-Jiménez, S. 2004. Consumo de oxígeno, excreción de amonio y capacidad osmorreguladora de Litopenaeus stylirostris (Stimpson) expuesto a diferentes combinaciones de temperatura y salinidad. Cien. Mar. 30(3):443-453.

Re, A. D., Díaz, F., Ponce-Rivas, E., Giffard, I., Muñoz-Marquez, M. E., & Sigala-Andrade, H. M. (2012). Combined effect of temperature and salinity on the Thermotolerance and osmotic pressure of juvenile white shrimp litopenaeus vannamei (Boone). Journal of Thermal Biology, 37(6), 413–418. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2012.04.004

Reyes-Ramos, C. A., Peregrino-Uriarte, A. B., Cota-Ruiz, K., Valenzuela-Soto, E. M., Leyva-Carrillo, L., & Yepiz-Plascencia, G. (2018). Phosphoenolpyruvate carboxykinase cytosolic and mitochondrial isoforms are expressed and active during hypoxia in the white shrimp Litopenaeus vannamei. Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology, 226(August), 1–9. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2018.08.001

Rosas, C., Martinez, E., Gaxiola, G., Brito, R., Díaz-Iglesia, E., & Soto, L. A. (1998). Effect of dissolved oxygen on the energy balance and survival of Penaeus setiferus juveniles. Marine Ecology Progress Series, 174(Lucas 1993), 67–75. https://doi.org/10.3354/meps174067

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. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 234(1), 41–57. https://doi.org/10.1016/S0022-0981(98)00139-7

SAGARPA. (2017). Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca Publicación, 300. Retrieved from www.conapesca.gob.mx

Sánchez, A., Pascual, C., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., Le Moullac, G., & Rosas, C. (2001). Hemolymph metabolic variables and immune response in Litopenaeus setiferus adult males: The effect of acclimation. Aquaculture, 198(1–2), 13–28. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00576-7

Scarpa, J. y Vaughan, D. 1998. Culture of marine shrimp Penaeus vannamei in fresh wáter. Book of abstracts of the World Aquaculture Society Meeting. Nevada, U.S.A. 473.

Schein, V., Wache, Y., Etges, R., Kucharski, L.C., van Wormhoudt, A., Da Silva, R.S., 2004. Effect of hyperosmotic shock on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and gluconeogenic activity in the crab muscle. FEBS Lett. 561, 202–206.

Schito, L., & Rey, S. (2017). Cell-Autonomous Metabolic Reprogramming in Hypoxia. Trends in Cell Biology, xx, 1–15. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.10.006

Schopf, F. H., Biebl, M. M., & Buchner, J. (2017). The HSP90 chaperone machinery. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 18(6), 345–360. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.20

Schreck, C. B. (2000). Accumulation and long-term effects of stress in fish. In The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare (eds. G. P. Moberg and J. A. Mench), pp. 147–158. Wallingford: CAB International.

Schulte, P. M. (2015). The effects of temperature on aerobic metabolism: Towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. Journal of Experimental Biology, 218(12), 1856–1866. https://doi.org/10.1242/jeb.118851

Schulte, P. M. (2014). What is environmental stress? Insights from fish living in a variable environment. Journal of Experimental Biology, 217(1), 23–34. https://doi.org/10.1242/jeb.089722

Seebacher, F., White, C. R., & Franklin, C. E. (2015). Physiological plasticity increases resilience of ectothermic animals to climate change. Nature Climate Change, 5(1), 61–66. https://doi.org/10.1038/nclimate2457

Seidman, E. R., & Lawrence, A. L. (1985). Growth. Feed digestibility, and proximate body composition of juvenile *Penaeus vannamei* and *Penaeus monodon* grown at different dissolved oxygen levels. Journal of the World Mariculture Society, 16(1–4), 333–346. https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1985.tb00214.x

Selak, M. A., Armour, S. M., MacKenzie, E. D., Boulahbel, H., Watson, D. G., Mansfield, K. D., Gottlieb, E. (2005). Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-α prolyl hydroxylase. Cancer Cell, 7(1), 77–85. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.11.022

Selvakumar, S., & Geraldine, P. (2005). Heat shock protein induction in the freshwater prawn Macrobrachium malcolmsonii: Acclimation-influenced variations in the induction temperatures for Hsp70. Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology, 140(2), 209–215. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.01.008

Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. Cell, 148(3), 399–408. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021

Shekhar, M. S., Kiruthika, J., & Ponniah, A. G. (2013). Identification and expression analysis of differentially expressed genes from shrimp (Penaeus monodon) in response to low salinity stress. Fish and Shellfish Immunology, 35(6), 1957–1968. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.09.038

Somero, G. N. (1997). Temperature relationships: from molecules to biogeography. In Handbook of Physiology, Section 13: Comparative Physiology, vol. II (ed. W. H. Dantzler), pp. 1391–1444. New York: Oxford University Press.

Soñanez-Organis, J. G., Peregrino-Uriarte, A. B., Gómez-Jiménez, S., López-Zavala, A., Forman, H. J., & Yepiz-Plascencia, G. (2009). Molecular characterization of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) from the white shrimp Litopenaeus vannamei and tissue-specific expression under hypoxia. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 150(3), 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. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 158(3), 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. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 393(1–2), 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(5), 1250–1260. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.02.015

Sornchuer, P., Junprung, W., Yingsunthonwattana, W., & Tassanakajon, A. (2018). Heat shock factor 1 regulates heat shock proteins and immune-related genes in Penaeus

monodon under thermal stress. Developmental and Comparative Immunology, 88(May), 19–27. https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.06.013

Spanopoulos-Hernández, M., Martínez-Palacios, C. A., Vanegas-Pérez, R. C., Rosas, C., & Ross, L. G. (2005). The combined effects of salinity and temperature on the oxygen consumption of juvenile shrimps Litopenaeus stylirostris (Stimpson, 1874). Aquaculture, 244(1–4), 341–348. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.11.023

Spees, J. L., Chang, S. A., Snyder, M. J., & Chang, E. S. (2002). Thermal acclimation and stress in the American lobster, Homarus americanus: Equivalent temperature shifts elicit unique gene expression patterns for molecular chaperones and polyubiquitin. Cell Stress and Chaperones, 7(1), 97–106. https://doi.org/10.1379/1466-1268(2002)007<0097:TAASIT>2.0.CO;2

Storch, D., Menzel, L., Frickenhaus, S., & Pörtner, H. O. (2014). Climate sensitivity across marine domains of life: Limits to evolutionary adaptation shape species interactions. Global Change Biology, 20(10), 3059–3067. https://doi.org/10.1111/gcb.12645

Strobel, A., Leo, E., Pörtner, H. O., & Mark, F. C. (2013). Elevated temperature and pco2 shift metabolic pathways in differentially oxidative tissues of notothenia rossii. Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology, 166(1), 48–57. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.06.006

Sung, Y. Y., Rahman, N. A., Shazili, N. A. M., Chen, S., Lv, A., Sun, J., … MacRae, T. H. (2018). Non-lethal heat shock induces Hsp70 synthesis and promotes tolerance against heat, ammonia and metals in post-larvae of the white leg shrimp Penaeus vannamei (Boone, 1931). Aquaculture, 483(September 2017), 21–26. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.034

Sung, Y. Y., Roberts, R. J., & Bossier, P. (2012). Enhancement of Hsp70 synthesis protects common carp, Cyprinus carpio L., against lethal ammonia toxicity. Journal of Fish Diseases, 35(8), 563–568. https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2012.01397.x

Tretter, L., Patocs, A., & Chinopoulos, C. (2016). Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis. Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics, 1857(8), 1086–1101. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2016.03.012

Trisciuoglio, D., Gabellini, C., Desideri, M., Ziparo, E., Zupi, G., & del Bufalo, D. (2010). Bcl-2 regulates HIF-1α protein stabilization in hypoxic melanoma cells via the molecular chaperone HSP90. PLoS ONE, 5(7). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011772

Ulaje-Fernández, S.A. 2015. Relación entre respuestas fisiológicas, contenido bioquímico y expresión del camarón blanco (Litopenaeus vannamei) ante cambios agudos y crónicos de hipertermia e hipoxia. Tesis de Maestría. CIBNOR. 144 pp.

Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., & Leunissen, J. A. M. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. Nucleic Acids Research, 35(SUPPL.2), 71–74. https://doi.org/10.1093/nar/gkm306

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., Van Roy, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology. https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034

Villarreal, H. y Ocampo, L. 1993. Effect of size and temperature on the oxygen consumption of the brown shrimp Penaeus californiensis postlarvae. Comp. Biochem. Physiol. 106A(1):103-107.

Vinagre, A.S., Da Silva, R.S.M., 2002. Effects of fasting and refeeding on metabolic processes in the crab Chasmagnathus granulata (Dana, 1851). Can. J. Zool. 80, 1413–1421.

Wandinger, S. K., Richter, K., & Buchner, J. (2008). The Hsp90 chaperone machinery. Journal of Biological Chemistry, 283(27), 18473–18477. https://doi.org/10.1074/jbc.R800007200

Wedemeyer, G.R.,Meyer, F.P., Smith,L. 1999. Environmental Stress and Fish Diseases. Narendra Publishing House, Delhi, India 107p.

Wu, R. S. S. (2002). Hypoxia: From molecular responses to ecosystem responses. Marine Pollution Bulletin, 45(1–12), 35–45. https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00061-9

Wyban, J., Walsh, W. A., & Godin, D. M. (1995). Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (Penaeus vannamei). Aquaculture, 138(1–4), 267–279. https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)00032-1

Zacarías-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 74 pp.

Zak, M. A., Regish, A. M., McCormick, S. D., & Manzon, R. G. (2017). Exogenous thyroid hormones regulate the activity of citrate synthase and cytochrome c oxidase in warm- but not cold-acclimated lake whitefish (Coregonus clupeaformis). General and Comparative Endocrinology, 247, 215–222. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.02.005

Zammit, V. A. (2008). Carnitine palmitoyltransferase 1: Central to cell function. IUBMB Life, 60(5), 347–354. https://doi.org/10.1002/iub.78

Zhang, P., Zhang, X., Li, J., & Huang, G. (2006). The effects of body weight, temperature, salinity, pH, light intensity and feeding condition on lethal DO levels of whiteleg shrimp, Litopenaeus vannamei (Boone, 1931). Aquaculture, 256(1–4), 579–587. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.020

Zhou, J., Wang, L., Xin, Y., Wang, W. N., He, W. Y., Wang, A. L., & Liu, Y. (2010). Effect of temperature on antioxidant enzyme gene expression and stress protein response in white shrimp, Litopenaeus vannamei. Journal of Thermal Biology, 35(6), 284–289. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2010.06.004

Zhou, J., Wang, W. N., He, W. Y., Zheng, Y., Wang, L., Xin, Y., … Wang, A. L. (2010). Expression of HSP60 and HSP70 in white shrimp, Litopenaeus vannamei in response to bacterial challenge. Journal of Invertebrate Pathology, 103(3), 170–178. https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.12.006