



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

RESPUESTA INMUNOLÓGICA Y METABÓLICA DE  
CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO (*Litopenaeus  
vannamei*) DURANTE LA ENFERMEDAD DE LA  
NECROSIS HEPATOPÁNCREATICA AGUDA (AHPND)

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en: Biotecnología)

P r e s e n t a

**Adrián Esteban Velázquez Lizárraga**

La Paz, Baja California Sur, mayo de 2021

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 9 horas del día 23 del Mes de abril del 2021, 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:

**"Respuesta inmunológica y metabólica de camarón blanco del pacífico (*Litopenaeus vannamei*) durante la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND)"**

Presentada por el alumno:

**Adrián Esteban Velázquez Lizárraga**

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

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



---

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle  
Co-Director



---

Dr. Ilie Sava Racotta Dmitrov  
Co-Director



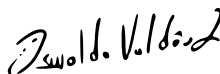
---

Dra. Norma Angelica Estrada Muñoz  
Co-Tutora



---

Dr. Humberto Villarreal Colmenares  
Co-Tutor



---

Dr. Oswaldo Valdés López  
Co-Tutor



---

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

La Paz, Baja California Sur, a 23 de abril de 2021.

Los miembros del comité de tesis del estudiante ADRIÁN ESTEBAN VELÁZQUEZ LIZÁRRAGA del Programa de Doctorado en Uso, Manejo y Preservación de los recursos naturales revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo. Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- **Herramienta anti-plagio:**  
iThenticate
- **Filtros utilizados:**  
Excluir citas y bibliografía  
Reporte de similitud
- **Porcentajes de similitud:**  
10%  
Se muestra captura de pantalla

### iThenticate

[Visualizador de documentos](#)  
Índice de similitud  
10%

### RESPUESTA INMUNOLÓGICA Y METABÓLICA DE CAMARON ...

Por: Adrián Esteban Velázquez Lizárraga

A partir de: 23 abr 2021 16:57:43  
27,050 words - 251 matches - 128 sources

### fuentes:

109 words / < 1% coincidencia - Internet  
[ri.agro.uba.ar](#)  
108 words / < 1% coincidencia - Internet de 17-sept-2020 12:00a. m.  
[journals.plos.org](#)  
91 words / < 1% coincidencia - Internet de 26-nov-2020 12:00a. m.  
[doczz.net](#)  
72 words / < 1% coincidencia - Internet de 21-jul-2020 12:00a. m.  
[cibnor.repositorioinstitucional.mx](#)  
69 words / < 1% coincidencia - Internet de 14-jul-2020 12:00a. m.  
[ciencia.urjc.es](#)  
68 words / < 1% coincidencia - Internet de 13-ene-2019 12:00a. m.  
[cibnor.repositorioinstitucional.mx](#)  
60 words / < 1% coincidencia - Internet  
[eprints.uanl.mx](#)  
52 words / < 1% coincidencia - Internet de 21-jul-2020 12:00a. m.  
[cibnor.repositorioinstitucional.mx](#)  
52 words / < 1% coincidencia - Internet  
[hdl.handle.net](#)  
44 words / < 1% coincidencia - Internet  
[eprints.uanl.mx](#)  
40 words / < 1% coincidencia - Internet  
[eprints.uanl.mx](#)  
39 words / < 1% coincidencia - Internet de 21-jul-2020 12:00a. m.  
[cibnor.repositorioinstitucional.mx](#)  
35 words / < 1% coincidencia - Internet  
[eprints.uanl.mx](#)  
35 words / < 1% coincidencia - Internet de 18-sept-2019 12:00a. m.  
[cibnor.repositorioinstitucional.mx](#)  
34 words / < 1% coincidencia - Internet de 19-feb-2014 12:00a. m.  
[www.repositoriodigital.ipn.mx](#)

### Firmas del comité



Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle  
Co-Director



Dr. Ilie Sava Racotta Dmitrov  
Co-Director



Dr. Humberto Villarreal Colmenares  
Co-tutor



Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz  
Co-tutora



Dr. Oswaldo Valdés López  
Co-tutor



**2020**  
ASO DE  
**LEONORA VICARIO**  
RENERMITA MADRE DE LA PATRIA



## **Conformación de Comités**

### **Comité Tutorial**

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.  
Co-Director de Tesis

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.  
Co-Director de Tesis

Dr. Humberto Villarreal Colmenares  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.  
Co-Tutor de Tesis

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.  
Co-Tutora de Tesis

Dr. Oswaldo Valdés López  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México  
Co-Tutor de Tesis

### **Comité Revisor de Tesis**

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle  
Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov  
Dr. Humberto Villarreal Colmenares  
Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz  
Dr. Oswaldo Valdés López

### **Jurado de Examen**

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle  
Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov  
Dr. Humberto Villarreal Colmenares  
Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz  
Dr. Oswaldo Valdés López

### **Suplentes**

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes  
Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra

## Resumen

La enfermedad hepatopancreática aguda (AHPND) es causada por la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* y es un severo problema en granjas de camarón a nivel mundial. El material infectivo de *V. parahaemolyticus* que causa la AHPND son las toxinas PirABvp codificados en un plásmido. El tejido diana de la enfermedad es el hepatopáncreas, aunque el estómago también tiene afectaciones. Los signos de la AHPND son: el desprendimiento de células epiteliales, la necrosis, la infiltración de hemocitos y la atrofia celular. En esta tesis se aborda principalmente que la AHPND causa afectaciones en el metabolismo y sistema inmune del camarón. Por lo que la sección experimental abordó 4 secciones: I) evaluación y caracterización de la cepa *V. parahaemolyticus* IPNGS16 y su concentración letal media (CL50), II) Evaluación de lesiones y el progreso de la AHPND mediante histología, III) Evaluación de variables bioquímicas en hepatopáncreas, músculo y hemolinfa durante la AHPND, IV) Evaluación de la expresión global y la expresión relativa de genes en hepatopáncreas y en hemolinfa mediante ARNm-seq y RT-qPCR. La cepa de *V. parahaemolyticus* IPNGS16 contiene el plásmido que codifica a las toxinas PirABvp, y se determinó que a menor concentración bacteriana menor mortalidad, a mayor concentración bacteriana mayor mortalidad. Las lesiones evaluadas por histología muestran que los signos de la AHPND aparecen a las 12 hpi y se agravan a las 24 hpi de manera significativa. Las variables bioquímicas en los tres tejidos fueron diferentes y dinámicas de acuerdo con el paso del tiempo. Los reportes de la patogénesis de la AHPND nos permiten relacionar 2 eventos, el primero con la infección de *V. parahaemolyticus* y el segundo con el efecto de las toxinas. Finalmente, la expresión global de genes en hepatopáncreas nos permitió entender y ligar procesos biológicos enriquecidos relacionados con la respuesta inmune, metabólica, y adhesión biológica. Mientras que con la expresión global en hemocitos logramos identificar el modelo de respuesta a insecticidas ejemplificando el dicloro difenil tricloroetano (DDT). La expresión relativa de genes del sistema antioxidante, hemocianina, coagulación entre otros, nos ayudó a corroborar la relación con los datos de ARNm-seq. La investigación y los datos obtenidos nos otorgan las pruebas para demostrar que existe un cambio metabólico e inmune en *L. vannamei* durante la AHPND a nivel expresión de genes y los cambios de las variables bioquímicas. Además, estos datos indican que la AHPND debe ser vista con el enfoque de la infección bacteriana y el efecto de las toxinas como un mismo evento, y no como un aislado. Lo anterior ayudará a entender mejor los mecanismos de la respuesta inmune y metabólica de *L. vannamei* ante la AHPND.

**Palabras clave:** *Litopenaeus vannamei*; AHPND; respuesta inmune; respuesta metabólica; *Vibrio parahaemolyticus*.

**Número de ORCID:** 0000-0001-7049-7209

Vo. Bo.




---

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle  
Co-Director de Tesis

Vo. Bo.




---

Dr. Ilie Sava Racotta Dmitrov  
Co-Director de Tesis

## Summary

Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND), caused by the marine bacteria *Vibrio parahaemolyticus*, is a considerable problem in shrimps farms. The *V. parahaemolyticus* infecting material is contained in a plasmid that encodes for the lethal toxins PirABvp, whose primary target tissue is the hepatopancreas, causing sloughing epithelial cells, necrosis, and massive hemocyte infiltration. This work is focused on the changes in the metabolic and immune systems caused by AHPND. The experimental section is divided into four sections: I) To evaluate and characterize the *V. parahaemolyticus* IPNGS16 strain and the lethal concentration (LC<sub>50</sub>). II) To evaluate lesion and progression of AHPND using histological techniques. III) To assess biochemical parameters in hepatopancreas, muscle, and hemolymph during AHPND. IV) To assess the global gene expression in hepatopancreas and hemocytes at 24 hours post-infection (hpi) using mRNA-seq and RT-qPCR. The *V. parahaemolyticus* IPNGS16 strain contains the plasmid that encodes the PirABvp toxins; using different bacteria concentrations, this strain shows dose-response toxicity, the higher concentration of bacteria, the higher the mortality in less time, and a low bacteria concentration results in less mortality. Histological evaluation of infected hepatopancreas indicates that the main signs of AHPND appear at 12 hpi and significantly worsen by 24 hpi. The biochemistry parameters acquired from the three tissues tested showed a dynamic and tissue-specific AHPND progression through time, although these results suggest relating to events, the first relate-bacterial infection and the second with the toxin-neutralization. Furthermore, the global gene expression analysis in the hepatopancreas reveals crosstalk between three enriched biological processes, the immune, metabolic, and biological adhesion processes. On the other hand, the global gene expression observed in hemocytes reflects a response like the insecticides model, more specifically to the DDT response. These findings deepen our understanding of the hepatopancreas and hemocyte response and the relative gene expression results obtained, validate, and corroborate the mRNA-seq data. This study shows that in the AHPND, the bacterial infection and the effect of toxins should be seen as the same event rather than two independent processes. Indeed, the results presented here increase our understanding of the immune- metabolic response of *L. vannamei* towards AHPND.

**Keywords:** Whiteleg shrimp; AHPND, immune response; metabolic response; *Vibrio parahaemolyticus*.

**Número de ORCID:** 0000-0001-7049-7209

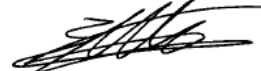
Vo. Bo.



---

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle  
**Co-Director de Tesis**

Vo. Bo.



---

Dr. Ilie Sava Racotta Dmitrov  
**Co-Director de Tesis**

## Dedicatoria

Quiero dedicar esta tesis a la memoria de mi padre

Adrián Velázquez Villegas (1961 - 2017)

*Et lux perpetua luceat eis.  
In memoria aeterna erit iustus,  
ab auditione mala non timebit.*

## **Agradecimientos**

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR), por la infraestructura brindada.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la Beca Nacional #466639 y la Beca Mixta #291276 otorgadas.

A los Proyectos de Investigación: Proyecto CONACyT de Infraestructura: #2696644, Proyecto Foins-CONACyT #296397, Proyecto Problemas Nacionales de CONACyT #247567.

A mis Co-Directores de Tesis al Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle, que ha sido mi mentor desde la Tesis de Licenciatura, hasta la del Doctorado. Al Dr. Ilie Sava Racotta Dmitrov por los comentarios, sugerencias que fortalecieron el trabajo de Tesis.

A los miembros del Comité Tutorial: la Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz que ha sacado lo mejor de mí como estudiante, al Dr. Humberto Villarreal Colmenares por todas esas ideas y enfoques aportados y al Dr. Oswaldo Valdés López que, siempre me brindó ideas y cuestionamientos que fortalecieron este trabajo.

A la Ing. Mayra de Fátima Vargas Mendieta, al Tec. Jesús Aguilar Villavicencio, y al Tec. Víctor Polo Murillo, por todo su apoyo y soporte técnico para el mantenimiento y manipulación de organismos.

Al Dr. Antonio Luna Gonzáles por brindar la cepa de *Vibrio parahaemolyticus* IPNGS16.

A mis compañeros la M. en C. Carla Alejandra Muñoz Rojas y al Biólogo Marino Ismael Mendoza Avilés por su apoyo durante los muestreos en los bioensayos.



Al Técnico Víctor Manuel Moyron Ibarra del Laboratorio de Patogénesis Microbiana.

A la M. en C. Delia Irene Rojas Posada Técnico del Laboratorio de Genética Molecular y al Tec. Arturo Sierra Beltrán.

Al Dr. Jesús Martín Ramírez Orozco, Técnico del Laboratorio de Inmunogenómica Marina por todo el apoyo brindado en su laboratorio.

Al M. en C. Julio Antonio Hernández González Técnico del Laboratorio de Biología Molecular de Plantas, por todo su apoyo teórico y técnico en la realización de esta tesis.

A la Dra. Martha Candelaria Reyes Becerril y al Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez por la asistencia técnica brindada.

A la Dra. Rosa Linda Salgado García Técnico del Laboratorio de Metabolismo Energético y a la M. en C. Nairobi Pacheco Carlón por toda su asistencia técnica.

A la Dra. María del Carmen Rodríguez Jaramillo y a la Tec. Eulalia Meza Chávez del Laboratorio de Histología e Histoquímica.

Al M. en C. Roberto Hernández Herrera, Técnico del Laboratorio de Bioquímica Fisiológica.

Al Dr. Ricardo Vázquez Juárez y a la Dra. Cristina Escobedo Fregoso, por su asistencia en el servidor de bioinformática.

Al equipo de redes del CIBNOR: Oscar Fischer Dorantes, Luis Carlos Moreno Galván, Roberto González Castellanos, Jorge Mario Rodríguez Meza y María Isabel Castro Hernández, que hicieron posible el trabajo en casa durante la pandemia de COVID-19.

A la Dra. Rosa María Morelos Castro, por todo su apoyo y asistencia técnica en los experimentos de RT-qPCR y todos los aportes realizados al trabajo.

A la Dra. Norma Angélica Ochoa Álvarez Técnico del Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico.

A todo el equipo de trabajo de Posgrado: Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra, Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro, Lic. Osvelia Ibarra Morales, Lic. Leticia Gonzáles Rubio Rivera, Lic. Ana María Talamantes Cota, a Tania Verónica Núñez Valdez, a Adriana Teresa Franzoni García, y en especial al Lic. Horacio Sandoval Gómez por toda la ayuda y soporte.

A la Dra. Anchalee Tassanakajon y al Dr. Wisarut Junprung de la Universidad de Chulalongkorn en Bangkok, Tailandia. Gracias por recibirme esos 5 meses y compartir sus enseñanzas.

Al M. en C. Germán Meléndrez Carballo, por su apoyo técnico en el manejo e instalación de paquetería relacionada con el software Python y Perl.

Al Dr. Pavel Eduardo Galindo Torres, por todo su apoyo, asesoría y soporte para el trabajo bioinformático realizado.

A mis compañeros del Posgrado en especial: al Dr. Mario Rojas Arzaluz, Dra. Beatriz Meza, Dra. Isabel Valle, Dra. Celene Hurtado, M. en C. Hamid Tejas, Valeria García.

A mi familia, principalmente a mi Madre Sergia Avelina Lizárraga Guerrero, mis hermanos América, Adriana y Samuel Velázquez Lizárraga, muchas gracias por acompañarme en este camino, su apoyo fue esencial.

A toda mi familia materna y paterna que incluye, tíos, tías, primos y primas por estar siempre cerca de mí.

A mi cuñado Rosember Mark de Luna y su Mamá Norma Villarreal por todo su invaluable apoyo.

A mi amiga del alma Karina Margarita Alonso Verdugo, por ser como una hermana para mí y a toda su familia que siempre me ha tratado como parte de ellos.

A mis amigos Socorro Morales y Miguel Tirado, gracias por siempre estar ahí, cuando más los necesito, los quiero.

A mi pareja Christian Omar Ortega Rosas, por acompañarme siempre, ser mi apoyo, mi soporte, mi fuerza, siempre te agradeceré tu apoyo incondicional para todo.

## Contenido

<b>Resumen</b> .....	i
<b>Summary</b> .....	ii
<b>Dedicatoria</b> .....	iii
<b>Agradecimientos</b> .....	iv
<b>Contenido</b> .....	viii
<b>Lista de figuras</b> .....	xi
<b>Lista de tablas</b> .....	xiv
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	xv
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	2
2.1 Biología de <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	2
2.2 El cultivo de <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	2
2.3 La enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda .....	3
2.4 Sistema inmunitario .....	4
2.5 Hepatopáncreas, metabolismo e inmunidad.....	5
2.6 Expresión de genes durante la AHPND.....	7
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	9
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	10
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	11
5.1 Objetivo general.....	11
5.2 Objetivos particulares.....	11
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	12
6.1. Reto con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> IPNGS16 y diseño experimental.....	12
6.1.1 Declaración de ética .....	12
6.1.2 Material biológico .....	12
6.1.3 Caracterización de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> IPNGS16.....	12
6.1.4 Determinación de la concentración letal 50 (LC <sub>50</sub> ).....	13
6.1.5 Diseño experimental.....	14
6.2 Evaluación de lesiones histopatológicas .....	15

6.2.1 Evaluación descriptiva.....	16
6.2.2 Evaluación semicuantitativa.....	16
6.2.3 Evaluación cuantitativa.....	17
6.3 Análisis de indicadores bioquímicos.....	17
6.3.1 Toma de muestras.....	17
6.3.2 Glucosa.....	18
6.3.3 Carbohidratos totales.....	18
6.3.4 Glucógeno.....	19
6.3.5 Lactato.....	19
6.3.6 Lípidos totales.....	20
6.3.7 Triglicéridos.....	20
6.3.8 Colesterol.....	21
6.3.9 Hemocianina.....	21
6.3.10 Proteínas totales.....	21
6.3.11 Análisis estadísticos.....	22
6.4 Análisis de expresión diferencial.....	22
6.4.1 ARNm-seq de hepatopáncreas y hemocitos.....	22
6.4.2 Ensamblaje de los transcriptomas y anotación funcional.....	23
6.4.3 Cuantificación de transcritos y análisis de expresión.....	24
6.4.4 Análisis de enriquecimiento de los términos GO.....	24
6.4.5 Análisis de redes de interacción proteína-proteína.....	25
6.4.6 Identificación de genes eje.....	25
6.5 Análisis de expresión relativa.....	25
6.5.1 Selección de genes.....	25
6.5.2 Análisis de estabilidad de los genes de referencia.....	26
6.5.3 Análisis de expresión relativa.....	28
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
7.1 Caracterización de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> IPNGS16.....	30
7.1.1 Tinción Gram y caracterización molecular de virulencia.....	30
7.1.2 Determinación de la concentración letal 50 (CL <sub>50</sub> ).....	31
7.2 Evaluación de lesiones histopatológicas.....	32

7.2.1 Evaluación descriptiva.....	32
7.2.2 Evaluación semicuantitativa.....	35
7.2.3 Evaluación cuantitativa.....	36
7.3 Indicadores bioquímicos.....	37
7.3.1 Indicadores bioquímicos en hemolinfa.....	37
7.3.2 Indicadores bioquímicos en hepatopáncreas.....	39
7.3.3 Indicadores bioquímicos en músculo.....	41
7.4 Análisis de expresión diferencial.....	42
7.4.1 Ensamblaje y anotación funcional.....	42
7.4.2 Análisis de expresión diferencial.....	46
7.4.3 Análisis de enriquecimiento GO y rutas metabólicas KEGG.....	50
7.4.4 Redes de interacción proteína-proteína.....	59
7.5 Análisis de expresión relativa (RT-qPCR).....	61
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>65</b>
8.1 Reto con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> IPNGS16.....	65
8.2 Daño histopatológico en la AHPND.....	66
8.3 Indicadores bioquímicos durante la AHPND.....	67
8.4 Análisis de expresión diferencial y relativa.....	71
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>81</b>
<b>10. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>83</b>
<b>11. ANEXOS.....</b>	<b>102</b>
11.1 Anexo A: Primer artículo.....	102
11.2 Anexo B: Segundo artículo.....	131

## Lista de figuras

- Figura 1.** Diagrama de toma de muestras. Los rombos rojos representan las muestras para expresión de genes en hepatopáncreas (n=9), los triángulos azules representan las muestras de ARNm-seq en hemocitos y hepatopáncreas (n=9), los círculos verdes representan la toma de muestras para histología (n=5), y los semicírculos negros representan la toma de muestras para bioquímica fisiológica en hemocitos, hepatopáncreas y músculo (n=6). .....15
- Figura 2.** Micrografía de *Vibrio parahaemolyticus* IPNGS16 con tinción Gram con un objetivo de 100×, en inmersión con aceite mineral. ....30
- Figura 3.** Productos de PCR de los genes *PHP* y *PirB* que demuestran la presencia del plásmido pVPAV-3 en la cepa de *Vibrio parahaemolyticus* IPNGS16. Se muestra un gel de electroforesis de agarosa al 1%. Carril 1: marcador de peso molecular (1 kb plus). Carriles 2 y 5: ADNg de la cepa *V. parahaemolyticus* IPNGS16. Carriles 3 y 6: ADNg la cepa de *V. parahaemolyticus* CAIM170, que no contiene el plásmido pVPAV-3. Carriles 4 y 7: control negativo (agua desionizada). .....31
- Figura 4.** Determinación de la CL<sub>50</sub> de *Vibrio parahaemolyticus* IPNGS16 en *Litopenaeus vannamei* suministrado por inmersión. A) Mortalidad acumulada vs el tiempo a distintas concentraciones de *V. parahaemolyticus* IPNGS16. B) Mortalidad acumulada en Probits vs el Log<sub>10</sub> de la concentración de bacterias a las 24 h. ....32
- Figura 5.** Micrografía del hepatopáncreas (Hep) de *Litopenaeus vannamei* a diferentes tiempos de exposición con *Vibrio parahaemolyticus* IPNGS16. A) 0 hpi, *L. vannamei* con células B (HpB). B) 12 hpi, las flechas muestran espacios en blanco de células desprendidas (Slo). C) 24 hpi, las flechas indican células picnóticas en estado de necrosis (Nec). D) 48 hpi, lumen (Lum), infiltración de hemocitos (Hem). E) 72 hpi, túbulos (Tub) atrofiados (Atr). F) 72 hpi, hemocito granular (HemG), hemocito hialino (HemH). Cortes longitudinales 4 µm en parafina, tinción hematoxilina y eosina. Barra de escala: 100 µm (A–E) y 30 µm (F) .....34
- Figura 6.** Evaluación cuantitativa de los signos de la AHPND en el hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei* a diferentes tiempos de exposición con *Vibrio parahaemolyticus*. A) Grado de desprendimiento celular. B) Grado de necrosis. C) Grado de atrofia. D) Grado de infiltración de hemocitos. Los puntos representan las medianas, la barra de error superior representa el cuartil Q<sub>3</sub> y la inferior el cuartil Q<sub>1</sub>. Las letras minúsculas las diferencias significativas entre los tiempos de cada parámetro evaluados por la prueba de Kruskal Wallis ( $\alpha = 0.05$ ) para todas las muestras. ....36
- Figura 7.** Evaluación cuantitativa del efecto de la AHPND en hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei* a diferentes tiempos de exposición con *Vibrio parahaemolyticus*. A) Altura de las células B ( $n = 5$ ). B) Área de los túbulos ( $n = 5$ ). Las barras representan la media y las barras de error representan el error estándar. Las letras minúsculas sobre las barras representan las diferencias significativas de la prueba ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) y la prueba Holm-Sidak ( $\alpha = 0.05$ ). ....37
- Figura 8.** Parámetros bioquímicos en hemolinfa post-infección. A) Concentración de glucosa. B) Concentración de hemocianina. C) Concentración de proteínas totales. D) Concentración de lípidos totales. E) Concentración de lactato. F) Concentración de colesterol. Las barras indican la media aritmética y error estándar ( $n = 6$ ). Los asteriscos

- indican diferencias significativas (T-Student) entre cada tiempo evaluado control e infectados por cada hora ( $\alpha = 0.05$ ).....38
- Figura 9.** Indicadores bioquímicos en hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei* expuestos con *Vibrio parahaemolyticus* a diferentes tiempos. A) Concentración de carbohidratos totales. B) Concentración de glucógeno. C) Concentración de lípidos totales. D) Concentración de triglicéridos. E) Concentración de proteínas totales. Las barras indican la media aritmética y error estándar ( $n = 6$ ). Los asteriscos indican diferencias significativas (T-Student) entre cada tiempo evaluado control e infectados por cada hora ( $\alpha = 0.05$ ). .....40
- Figura 10.** Parámetros bioquímicos en músculo de *Litopenaeus vannamei* expuestos a *Vibrio parahaemolyticus* a diferentes tiempos. A) Concentración de carbohidratos totales. B) Concentración de glucógeno. C) Concentración de lípidos totales. D) Concentración de proteínas totales. Las barras indican la media aritmética y error estándar ( $n = 6$ ). Los asteriscos indican diferencias significativas (T-Student) entre cada tiempo evaluado control e infectados por cada hora ( $\alpha = 0.05$ ).....41
- Figura 11.** Anotación de GO de las bibliotecas ensambladas de *Litopenaeus vannamei* de diferentes tejidos. A) Biblioteca de hepatopáncreas por inmersión. B) Hemocitos por inmersión. C) Hemocitos inyección que corresponden a los datos ya publicados [40].....44
- Figura 12.** Porcentaje de Anotaciones COG. Se muestra el porcentaje de las funciones ortólogas de las 3 bibliotecas ensambladas y anotadas con el protocolo de Trinotate. ....45
- Figura 13.** Gráficas de volcán de los genes expresados diferencialmente (DEGs) en las 3 bibliotecas de *Litopenaeus vannamei* analizadas. El eje de las  $x$   $\log_2$  (FC) y el de las  $y$   $-\log_{10}$ (pValue). El color negro representa los genes que no tuvieron cambios significativos, el azul representa  $FDR \leq 0.001$  y tasa de cambio  $\log_2 \geq 2$ ,  $FDR \leq 0.001$  y tasa de cambio  $\log_2 \geq 10$ . Los números en rojo representan el número de genes que disminuyeron su expresión y los números de azul oscuro representan aquellos que aumentaron su expresión. Los números color verde representan aquellos que su tasa de cambio  $\log_2 \geq 11$ . .....47
- Figura 14.** Diagrama de Venn de los resultados de genes de *Litopenaeus vannamei* alineados con el algoritmo BLASTx con la base de datos del genoma. A) Genes que aumentaron su expresión. B) Genes que disminuyeron su expresión. LvHep representa hepatopáncreas inmersión, LvHem representa hemocitos inmersión y LvChi representa hemocitos inyección [40].....48
- Figura 15.** Análisis de enriquecimiento de los términos GO, biblioteca hepatopancreas inmersión de *Litopenaeus vannamei*. La figura muestra el número de términos de la GO, las barras rojas representan los procesos biológicos, las verdes las funciones moleculares y las azules los componentes celulares. A) Términos de los transcritos diferencialmente expresados enriquecidos. B) Términos de los transcritos diferencialmente expresados agotados. La prueba hipergeométrica se realizó con un valor de  $P < 0.001$ . .....52
- Figura 16.** Análisis de enriquecimiento de los términos GO, biblioteca hemocitos inmersión de *Litopenaeus vannamei*. La figura muestra el número de términos de la GO, las barras rojas representan los procesos biológicos, las verdes las funciones moleculares y las azules los componentes celulares. A) Términos de los transcritos diferencialmente expresados enriquecidos. B) Términos de los transcritos diferencialmente expresados agotados. La prueba hipergeométrica se realizó con un valor de  $P < 0.001$ . .....53
- Figura 17.** Análisis de enriquecimiento de los términos GO, biblioteca hemocitos inyección de *Litopenaeus vannamei*. La figura muestra el número de términos de la GO, las



barras rojas representan los procesos biológicos, las verdes las funciones moleculares y las azules los componentes celulares. A) Términos de los transcritos diferencialmente expresados enriquecidos. B) Términos de los transcritos diferencialmente expresados agotados. La prueba hipergeométrica se realizó con un valor de $P < 0.001$ . .....	54
<b>Figura 18.</b> Ruta del Fagosoma (ko04145). Los genes que aumentaron su expresión de las 3 bibliotecas relacionados con la ruta del Fagosoma. Los triángulos amarillos representan la biblioteca de hepatopáncreas por inmersión, los verdes hemocitos por inmersión y azul hemocitos por inyección [40]. .....	55
<b>Figura 19.</b> Ruta Salvador-Warts-Hippo (dme04391). Los genes que aumentaron su expresión de las 3 bibliotecas relacionados con la ruta del Fagosoma. Los triángulos amarillos representan la biblioteca de hepatopáncreas por inmersión, los verdes hemocitos por inmersión y azul hemocitos por inyección [40]. .....	57
<b>Figura 20.</b> Redes de interacción proteína-proteína de bibliotecas genómicas de <i>Litopenaeus vannamei</i> . A) Biblioteca de hepatopáncreas por inmersión. B) Biblioteca de hemocitos inmersión. C) Biblioteca hemocitos inyección, datos de Zhang <i>et al.</i> , [40]. Los triángulos rojos representan los genes que disminuyeron su expresión, los azules representan los genes que disminuyeron su expresión. Los círculos grises representan los predichos por <i>GeneMANIA</i> . .....	60
<b>Figura 21.</b> Estabilidad de los genes de referencia con el tratamiento de organismos de <i>Litopenaeus vannamei</i> infectados con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en el hepatopáncreas. Las barras indican la media geométrica obtenida de los 4 algoritmos (Delta CT, BestKeeper, GeNorm y Normfinder) las líneas de error indican error estándar ( $n = 4$ ). .....	61
<b>Figura 22.</b> Expresión relativa de ARNm de genes relacionados al sistema inmune de <i>Litopenaeus vannamei</i> durante la infección con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en hepatopáncreas. Resultados de RT-qPCR mostrando la expresión relativa de los genes de interés. Para todas las gráficas el eje de las X muestra el tiempo post-infección (hpi), el eje de las Y muestra la expresión relativa (gen blanco/ <i>LvRPL7</i> ); las barras muestran la media y las líneas de error representan el error estándar ( $n = 9$ ). La línea continua representa los valores normalizados del tiempo cero y las letras muestran las diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). A) Superóxido dismutasa citosólica. B) Peroxirredoxina. C) Proteína de coagulación. D) Hemocianina. E) Trombospondina. F) Proteína de susceptibilidad a apoptosis. ....	63
<b>Figura 23.</b> Expresión relativa de ARNm de genes relacionados al metabolismo de <i>Litopenaeus vannamei</i> durante la infección con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en hepatopáncreas. Resultados de RT-qPCR mostrando la expresión relativa de los genes de interés. Para todas las gráficas el eje de las X muestra el tiempo post-infección (hpi), el eje de las Y muestra la expresión relativa (gen blanco/ <i>LvRPL7</i> ); las barras muestran la media y las líneas de error representan el error estándar ( $n = 9$ ). La línea continua representa los valores normalizados del tiempo cero y las letras muestran las diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). A) Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. B) Quimotripsina. C) Gen regulado positivamente por hipoxia. D) Catepsina L. ....	64

## Lista de tablas

<b>Tabla I.</b> Guía general para dar un valor numérico cualitativo del grado de severidad al daño considerado para el hepatopáncreas [50]. .....	16
<b>Tabla II.</b> Lista de oligonucleótidos utilizados para expresión relativa. ....	27
<b>Tabla III.</b> Resumen de estadísticas de las tres bibliotecas ensambladas. Hemocitos inyección corresponde a la biblioteca publicada [40]. .....	42
<b>Tabla IV.</b> Resultados del diagrama de Venn de genes que aumentaron su expresión. LvHep representa hepatopáncreas inmersión, LvHem representa hemocitos inmersión y LvChi representa hemocitos inyección [40]. El total representa los genes que coincidieron en los análisis, posteriormente el nombre y acceso para la base de datos del NCBI. ....	49
<b>Tabla V.</b> Resumen de las rutas metabólicas de los genes que aumentaron su expresión en las tres bibliotecas. Hepatopáncreas inmersión (LvHep), hemocitos inmersión (LvHem) y Hemocitos inyección (LvChi). .....	56
<b>Tabla VI.</b> Resumen de las rutas metabólicas de los genes que disminuyeron su expresión en las tres bibliotecas. Hepatopáncreas inmersión (LvHep), hemocitos inmersión (LvHem) y Hemocitos inyección (LvChi). .....	58

## Lista de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHPND	Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero/transcrito
ARNm-Seq	Secuenciación masiva del ARN mensajero.
CC	Componente celular (ontología GO)
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
DEG	Genes diferencialmente expresados
DETs	Transcritos diferencialmente expresados
dNTP	Nucleósido trifosfato (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
EMS	Síndrome de la mortalidad temprana
FC	Tasa de cambio (Por sus siglas en inglés <i>Fold Change</i> )
FDR	Tasa de descubrimientos falsos (Por sus siglas en inglés <i>False Discovery Rate</i> )
FM	Funciones moleculares (ontología GO)
Genes AE	Genes que aumentaron su expresión
Genes DE	Genes que disminuyeron su expresión
GO	Ontología génica ( <a href="#">gene ontology</a> )
hpi	Horas post-infección
CL <sub>50</sub>	Concentración letal media
miARN	Ácido ribonucleico pequeño nuclear
NO	Óxido nítrico
pb	Pares de bases
PB	Procesos biológicos (ontología GO)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PirAB <sup>VP</sup>	Toxinas relacionadas a insectos de <i>Photorhabdus</i> A y B (Por sus siglas en inglés <i>Photorhabdus insect-related toxin</i> )
TPM	Transcritos por millón

UFC	Unidades formadoras de colonias
UPS	Unidades prácticas de salinidad
USD	Dólares americanos

## 1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) tiene efectos significativos en las economías locales y regionales contribuyendo a la creación de empleo y desarrollo económico general, tanto en México como en otras partes del mundo [1]. Debido al aumento de la comercialización y diversificación de la industria camaronícola, se ha favorecido la introducción, propagación y transmisión de enfermedades, relacionadas con bacterias, virus y parásitos [2]. En 2009 se reportaron mortandades masivas de camarones (90 – 100%) en granjas de cultivo en China, las cuales se extendieron en el sudeste asiático, y en un principio se le denominó Síndrome de la Mortalidad Temprana (EMS) [3]. En el 2013 identificaron al agente causal, la cual es una bacteria del género *Vibrio* que contiene a las toxinas PirAB, que están codificadas en el plásmido pVPAV-3 [4].

Dada la gravedad de esta enfermedad, diversos grupos de investigación de todo el mundo han trabajado para entender el agente causal, el manejo y el control, así como la detección con técnicas histológicas y moleculares [5]. Una vez que se describió la enfermedad a nivel histopatológico, se nombró la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND), en el cual se observó que las células epiteliales de los túbulos del hepatopáncreas (E, F, B y R) desarrollan necrosis, desprendimiento celular, infiltración masiva de hemocitos y atrofia celular [6,7].

Actualmente no existe una cura o solución de este problema y se han abordado diversos estudios sobre los métodos de manejo y control en las granjas camaronícolas [8]. Asimismo, no se ha investigado a profundidad los efectos fisiológicos y metabólicos que provoca esta enfermedad a nivel celular y molecular en el camarón. En el presente trabajo se evaluó la respuesta del sistema de defensa y el metabolismo energético de *L. vannamei* durante la AHPND, con el objetivo de tener un mejor entendimiento de la enfermedad y posteriormente establecer nuevos enfoques de investigación.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Biología de *Litopenaeus vannamei*

El camarón blanco *L. vannamei* (Crustacea: Decapoda), se distribuye en la costa oriental del Océano Pacífico, desde el Alto Golfo de California hasta las costas de Perú. Los adultos se encuentran en ambientes marinos tropicales, las postlarvas y la etapa juvenil se encuentran en zonas estuarinas y lagunas costeras [9,10].

La morfología interna está compuesta por un sistema nervioso que consiste en ganglio supraesofágico conectado a una cuerda nerviosa ventral. El sistema digestivo se conforma por las mandíbulas, el estómago, la glándula digestiva (hepatopáncreas), un intestino medio y el ano. El sistema excretor comprende la glándula antenal y maxilar cuyas funciones principales son regular el equilibrio de sales y agua. El sistema respiratorio está compuesto por las branquias, las encargadas de realizar el intercambio de gases. El sistema circulatorio es abierto, el corazón bombea la hemolinfa y fluye en un inicio a través de vasos sanguíneos que terminan en senos sin paredes definidas, a partir de los cuales se lleva a cabo el intercambio de solutos con los tejidos; el pigmento respiratorio de *L. vannamei* es la hemocianina que está unida a iones de cobre [10].

### 2.2 El cultivo de *Litopenaeus vannamei*

*L. vannamei* es un recurso que se captura en altamar en su forma silvestre, debido a sus características biológicas y a la alta demanda de consumo *per cápita* este se ha producido en granjas camaronícolas reemplazando la pesca. La producción en 2010 de animales acuáticos se estimó en 148 millones de toneladas a nivel mundial, de las cuales, 128 millones son consumidas principalmente por los humanos. En 2018 se reportaron 4.9 millones de toneladas de producción de camarón blanco a nivel mundial [11]. La acuicultura del camarón en México ha tenido un gran crecimiento en los últimos 20 años y los principales estados productores se encuentran en el Noroeste de México: Sonora,

Sinaloa, Nayarit y Baja California Sur, que en conjunto produjeron 100 mil toneladas en 2016 [1]. Sin embargo, las pérdidas asociadas a la incidencia de enfermedades en el cultivo de camarón representan una problemática a nivel mundial para la industria camaronícola, principalmente por brotes virales (80%) y bacterianos (20%) causando impacto económico [12].

En 2009, en China se reportó por primera vez el Síndrome de La Mortalidad Temprana (EMS) y esta enfermedad se empezó a extender al sudeste asiático a países como Vietnam (2010), Malasia (2011) y Tailandia (2012). En ese entonces se desconocía el agente causal de la EMS y el nombre se otorgó porque se causaban mortalidades masivas, días posteriores de la siembra postlarval. La enfermedad afectó severamente a los países asiáticos reportando pérdidas de 140 mil toneladas de 2010 - 2012. En México se reporta por primera vez en 2013 y las pérdidas se estimaron en 118 millones de dólares [7].

El análisis de la patología de esta enfermedad mediante métodos histológicos aplicados en especímenes recolectados en eventos de mortalidad, reveló que las células epiteliales de los túbulos del hepatopáncreas tenían signos evidentes de necrosis, por lo que se le denominó la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) [13].

### **2.3 La enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda**

La AHPND se caracteriza por la necrosis, el desprendimiento de células epiteliales y una infiltración masiva de hemocitos [13,14]. El agente causal de la AHPND es la bacteria *Vibrio spp.* que produce las toxinas PirAB<sup>vp</sup>. [13,15]. *V. parahaemolyticus* es un bacilo gram-negativo, halófilo, anaerobio facultativo y mide de 0.5 - 0.8  $\mu\text{m}$  x 1.4 - 2.4  $\mu\text{m}$ . Estas bacterias poseen un plásmido que contiene una región codificante a las toxinas binarias PirA<sup>vp</sup> y PirB<sup>vp</sup> (PirAB<sup>vp</sup>), toxinas homólogas a las *Pir* (toxina relacionada insectos de *Photobacterium*) provenientes de bacterias del género *Photobacterium* [13].

La AHPND se ha reportado en tres especies de camarón *Penaeus monodon*, *Fenneropenaeus chinensis* y *L. vannamei*. Para las tres especies, se ha observado una mortalidad hasta del 100% entre los 20 – 30 días de cultivo inicial en granjas. Los signos clínicos se manifiestan como letargo, disminución del crecimiento, nado errático, sistema digestivo vacío y además una decoloración en el hepatopáncreas, causada por la pérdida de conectividad de los tejidos epiteliales de la pigmentación [7].

Las principales lesiones de las toxinas se observan en el hepatopáncreas, con la degeneración aguda progresiva en las células R, B, F y E, con cariomegalia (núcleo alargado) y el desprendimiento de células que conforman el túbulo. Las células desprendidas representan un sustrato para el crecimiento de bacterias (*Vibrio* spp.) y causan la completa destrucción del hepatopáncreas y la fase de muerte [16].

La patogénesis de *V. parahaemolyticus* AHPND consiste en la entrada de la bacteria por vía oral y la colonización del estómago, donde se inicia la producción de las toxinas PirAB<sup>VP</sup>. Después de 6 horas post-infección (hpi) se observan los signos clínicos, como desprendimiento de células epiteliales y necrosis. Posteriormente, la carga bacteriana aumenta, el sistema inmune del camarón es capaz de eliminar a las bacterias, sin embargo, no elimina las toxinas, lo cual explica la alta letalidad. Finalmente, en la etapa tardía de la enfermedad se observa una infección secundaria causada por bacterias [14,16].

Actualmente existe información limitada sobre la respuesta del sistema inmunitario de camarones peneidos en contra de la AHPND. Por esta razón, es de importancia el estudio del mecanismo de defensa de *L. vannamei* en contra de la infección de *V. parahaemolyticus* y el efecto de las toxinas PirAB<sup>VP</sup> sobre la respuesta metabólica e inmunitaria.

## **2.4 Sistema inmunitario**

El sistema inmunitario es el encargado de defender a los organismos de virus, bacterias y patógenos a través de procesos biológicos especializados. El sistema inmunitario de los



camarones peneidos está conformado por una barrera física que componen el exoesqueleto y la epidermis, que contiene una estructura celular con una red de polímeros de quitina y un refuerzo de proteínas estructurales. La hemolinfa es otro componente inmunitario que intervienen en la coagulación y melanización de heridas [17]. También poseen las respuestas celulares de los hemocitos y otras células especializadas que participan en: la coagulación, adhesión, fagocitosis, generación de moléculas citotóxicas y reparación de heridas [18]. Por otro lado, las reacciones de defensa de tipo humoral comprenden diferentes moléculas y mecanismos, como: los péptidos antimicrobianos, las proteínas que reconocen patrones, las proteinasas e inhibidores de proteasas, las moléculas que componen al sistema profenol oxidasa (proPO), las rutas de muerte celular programada y el sistema antioxidante [18] Estas reacciones de defensa y mecanismos moleculares están mediados por distintas rutas de señalización: la ruta *Toll-like* receptor, la ruta de inmunodeficiencia (IMD) y la ruta JAK/STAT [19]. La ruta *Rho* es clave para comprometer la integridad de la barrera estomacal durante la AHPND, la cual está controlada por la regulación del citoesqueleto. Este hecho está respaldado por los experimentos de Ng *et al.*, [20], que mostraron que el inhibidor de *Rho* en camarones retrasó la infección de AHPND, y en el caso del tratamiento con activador de *Rho* se observó mayor patogenicidad del *V. parahaemolyticus*. Además se encontró que el estómago es una barrera física de defensa con interrupción, ya que se observa una alteración en las células epiteliales del hepatopáncreas, en aquellos tratamientos con el activador *Rho* silenciado mediante ARN de doble cadena [20].

## **2.5 Hepatopáncreas, metabolismo e inmunidad**

El hepatopáncreas en sus primeras descripciones se llamó glándula digestiva y se sabía que era el principal órgano en los procesos de digestión en moluscos y crustáceos [21]. El hepatopáncreas, por su terminología hace referencia al hígado y al páncreas de los vertebrados, aunque este órgano no es homólogo a las funciones. El hepatopáncreas está compuesto por túbulos y está arborizado a ramas primarias y secundarias, estos túbulos están compuestos de células epiteliales que están especializadas en la absorción de

nutrientes, endocitosis, digestión de partículas de alimento, almacenamiento de lípidos y glucógeno, excreción de nitrógeno, y almacenamiento de calcio. Asimismo, cumple otras funciones como la homeostasis mineral, la síntesis de hormonas, la detoxificación de metales pesados, y el desarrollo de la tasa metabólica durante el ciclo de muda [22,23].

En el tracto digestivo y hepatopáncreas de crustáceos existe un microbioma que interviene en el proceso de absorción de nutrientes. Estos tejidos realizan endocitosis de restos celulares de bacterias e incluso de bacterias enteras, por lo cual el hepatopáncreas juega un papel muy importante como parte del sistema inmunitario, dado que una parte de estas bacterias son potencialmente nocivas [24,25]. Referente a las funciones inmunes del hepatopáncreas estas incluyen el envolvimiento celular de partículas y restos solubles de bacterias. En *P. monodon* se ha descrito la transicitosis, que consiste en presentar antígenos virales mediada por lisosomas, aunque se desconoce el mecanismo de procesamiento y liberación [26,27]. Debido a estas interacciones de las células epiteliales del hepatopáncreas, este tejido es capaz de producir hemocianina, varios tipos de lectinas, ferritinas, inhibidores de serin-proteasa, enzimas proteolíticas y producción de óxido nítrico (NO) que representan moléculas del sistema inmunitario innato capaces de reconocer y eliminar patógenos y virus [28–30].

Durante una infección bacteriana, se producen radicales libres, se reduce la producción de ATP, se incrementa la actividad de las transaminasas, existen fugas de enzimas mitocondriales y citoplasmáticas del hepatopáncreas hacia la hemolinfa [31,32]. Los cambios en el metabolismo inducidos por infecciones bacterianas son desfavorables para la defensa, ya que incrementan la producción de radicales libres y generan un estrés de señalización. Experimentos en el cangrejo *Eriocheir sinensis* muestran cambios metabólicos específicos para diversos patógenos [33]. Las infecciones virales y bacterianas provocan cambios en diversos metabolitos del hepatopáncreas, en metabolismo de aminoácidos, osmolitos, intermediarios del ciclo de Krebs (succinato y fumarato) y los relacionados al metabolismo energético (ATP, glucosa y glucógeno), estos cambios pueden inducir la demanda de energía para compensar el estrés hiposmótico [34].

Las infecciones incrementan la síntesis de aminoácidos ramificados como la valina, leucina e isoleucina, estos aminoácidos son parte del componente estructural de la hemocianina de crustáceos [35,36]. En el caso de la arginina se cree que impide la síntesis de NO con la inhibición competitiva de la óxido nítrico sintasa [37]. La producción de NO se considera una respuesta inflamatoria en combinación a la producción de citosinas. En vertebrados la señalización por citosinas puede causar enfermedades metabólicas e inflamación crónica [38]. La respuesta inflamatoria de los vertebrados e invertebrados comparten un mismo origen evolutivo, aunque el hepatopáncreas produce citosinas, no se ha estudiado profundamente si estas afectan el metabolismo [39]. Genes homólogos de citosinas en mamíferos han sido detectadas en *L. vannamei* y se sugiere que tienen un papel fundamental en la activación de la respuesta inmune [18].

## **2.6 Expresión de genes durante la AHPND**

La respuesta de la expresión de genes durante la AHPND ha sido estudiada en varios camarones peneidos. En un estudio de *L. vannamei* se revela la respuesta transcripcional de hemocitos durante la AHPND, donde se encontró un aumento de expresión de genes relacionados con procesos de metabolismo de carbohidratos, metabolismo de lípidos y aminoácidos, además se encontraron un grupo de genes relacionados a la anti-apoptosis [40]. En el langostino *Exopalaemon carinicauda* (Holthuis, 1950), se realizó un análisis de transcriptoma en hepatopáncreas en respuesta a la AHPND y se encontró un total de 229 genes diferencialmente expresados donde 127 genes están relacionados con función inmune, además se encontraron rutas asociadas a la patogénesis del AHPND y al sistema de defensa [41]. En el análisis transcripcional de *P. monodon* en estómago, se detectaron 141 genes relacionados con la respuesta inmune que incluía categorías funcionales a nivel de péptidos antimicrobianos, transducción de señales, ruta proPO, estrés oxidativo, proteínas e inhibidores de proteinasas, proteínas relacionadas a apoptosis, reconocimiento de patrones y sistema de coagulación [42]. En un estudio de ARNs pequeños (miARN), se detectaron

83 miARN diferencialmente expresados en hemocitos y se reveló que sus genes diana estaban envueltos en rutas metabólicas, amebiosis e infecciones por *Vibrio cholerae* [43].

Dado los antecedentes anteriormente presentados se plantean las siguientes preguntas científicas. ¿Cuál es la respuesta transcripcional de *L. vannamei* durante la AHPND? ¿Encontraremos evidencia que, durante la AHPND se modifican parámetros bioquímicos de *L. vannamei* como respuesta metabólica?

### 3. JUSTIFICACIÓN

La AHPND es una enfermedad que afecta a camarones, causando hasta el 90% de mortalidad en estanques de cultivo. El camarón blanco *L. vannamei* es el segundo crustáceo más cultivado a nivel mundial, y desde 2009 se reporta por primera vez la AHPND en Asia causado por *V. parahaemolyticus*. En México, en el 2013, las granjas de Sonora, Sinaloa, y Nayarit registraron brotes de *V. parahaemolyticus* causando AHPND en los cultivos y como consecuencia la pérdida de millones de dólares.

Actualmente se conoce el agente causal de la AHPND, y se han desarrollado métodos histológicos y moleculares para detectarlo tempranamente, por lo que existe información de la patogénesis y de los efectos de esta enfermedad en los cultivos, pero no hay información suficiente de la respuesta metabólica e inmunitaria de *L. vannamei* durante la AHPND; de este punto radica la importancia y la pertinencia de esta tesis, ya que se aborda por medio de la genómica funcional, la respuesta metabólica e inmune. La generación de esta información abre puertas para conocer de manera funcional genes y la predicción de proteínas que aún no han sido estudiadas en *L. vannamei*.

#### **4. HIPÓTESIS**

La enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) afecta al hepatopáncreas, tejido clave en *Litopenaeus vannamei* para el control, mantenimiento del metabolismo sistémico y sistema inmune, por lo tanto, se identificarán genes, rutas y procesos involucrados en la respuesta inmune y metabólica del organismo durante la AHPND.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Evaluar la respuesta inmunológica y metabólica del camarón blanco del Pacífico (*L. vannamei*) durante la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND).

### 5.2 Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto de la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) en *L. vannamei* a nivel histopatológico.
2. Determinar el curso temporal de indicadores bioquímicos de *L. vannamei* durante la necrosis hepatopancreática aguda.
3. Analizar la expresión diferencial de genes de respuesta inmune y metabólicos de *L. vannamei* durante la AHPND en hepatopáncreas y hemocitos mediante secuenciación del ARNm (mRNA-Seq).
4. Seleccionar y analizar la expresión relativa de genes inmunes y metabólicos durante la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda por PCR cuantitativo en tiempo real (RT-qPCR).

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. Reto con *Vibrio parahaemolyticus* IPNGS16 y diseño experimental**

#### **6.1.1 Declaración de ética**

Todos los organismos usados para este trabajo experimental fueron manejados de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). Las postlarvas de *L. vannamei* fueron obtenidas del Laboratorio de Larvas Granmar S. A. de C. V. y transportadas a los estanques del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., con todos los permisos de CONAPESCA, *L. vannamei* no se considera una especie en peligro o protegida. Los organismos fueron trasladados al laboratorio húmedo cuando alcanzaron los 12 g de peso.

#### **6.1.2 Material biológico**

Organismos sanos de *L. vannamei* ( $12.26 \pm 0.022$  g) fueron mantenidos en tanques de 1000 L de PVC, con agua de mar filtrada (1  $\mu$ m) y aireada con piedras difusoras, una salinidad de 35 PSU a 25 °C. Los organismos fueron aclimatados por una semana y se alimentaron *ad libitum* con alimento comercial (Camaronina, Purina). La cepa patógena de *V. parahaemolyticus* IPNGS16 fue aislada y caracterizada de camarones muertos presuntamente por AHPND de granjas de Guasave, Sinaloa.

#### **6.1.3 Caracterización de *Vibrio parahaemolyticus* IPNGS16**

La cepa de *V. parahaemolyticus* IPNGS16 fue reactivada en caldo soya triptona (TSB) (BD Difco) adicionado con 2.5% de NaCl (TSB+) e incubada a 28 °C por 16 h a 120 RPM. Se utilizaron 10  $\mu$ L de cultivo y fueron inoculados en una placa de agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) (BD, Difco) por estría cruzada e incubado a 30 °C por 24 h. Una sola colonia fue inoculada en TSB+ e incubada como se mencionó antes, posteriormente una



alícuota fue utilizada para realizar tinción Gram para examinar la morfología bacteriana. Se realizó una extracción de DNA genómico como lo mencionan Tyagi *et al.*, [44]. La identificación de los genes de virulencia *PHP* y *PirB* se realizó por PCR punto final. Las reacciones se llevaron a cabo en 25  $\mu$ L que contenían: 2.5 mM de  $MgCl_2$ , 0.2 mM de dNTP (cada uno), 1X de buffer *GoTaq Flexi DNA polymerase system* (Promega), 1.25 U de polimerasa *GoTaq Flexi*, 0.8  $\mu$ M de cada oligonucleótido y 2  $\mu$ L de ADN (50 ng). Los oligonucleótidos para el gen *PHP* fueron el directo: (5'–TTCTCACGATTGGACTGTGCG–3') y el inverso (5'–CACGACTAGCGCCATTGTTA–3') [45]. Para amplificar el gen de *PirB* diseñamos los siguientes: directo (5'–TACGCCAAATGAGCCAGA–3') y el inverso (5'–ACCAACTACGAGCACCCATC–3'). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial 94 °C por 2 min, 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 60 °C por 25 s y 72 °C por 30 s, y finalmente una extensión de 72 °C por 5 min. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1.2% en buffer tris-acetato EDTA (TAE 1X) y fue teñido con el colorante comercial *Red Gel IX* (Biotium, Fremont, USA). Los productos de PCR fueron secuenciados por Sanger en ambos sentidos. Los pesos moleculares de los productos de PCR fueron 501 pb y 272 pb de *PirB* y *PHP* del plásmido pVPA3-1 (KM067908.1) [46].

#### 6.1.4 Determinación de la concentración letal media ( $CL_{50}$ )

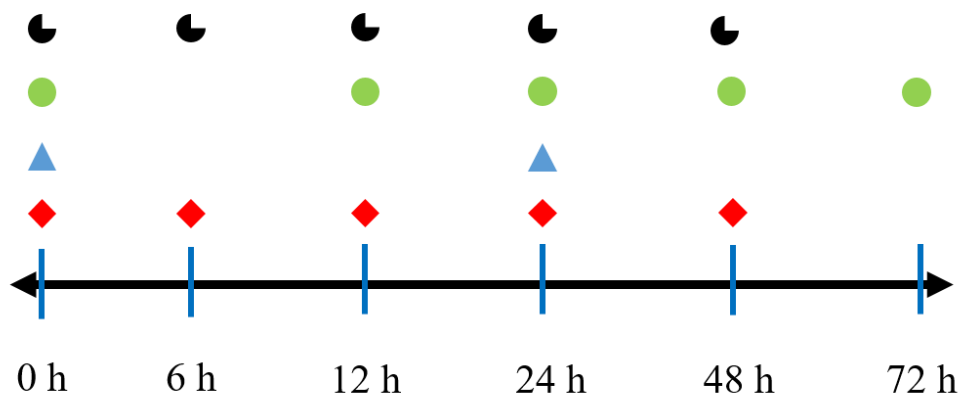
Los organismos fueron transferidos a unidades experimentales de 40 L con 20 L de agua de mar filtrada (1  $\mu$ m) con aireación continua y una salinidad de 35 UPS. 10 organismos fueron colocados en cada unidad y aclimatados por 3 días a 28 °C. Para calcular la  $CL_{50}$ , se probaron 5 concentraciones de bacteria, cada concentración se evaluó por triplicado.

*V. parahaemolyticus* IPNGS16 se reactivó de -80 °C en 30% de glicerol en medio TSB+ y fue incubado a 28 °C por 16 h a 120 RPM. El cultivo fue centrifugado a  $2,600 \times g$  por 20 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y los pellets fueron lavados y resuspendidos en solución salina (2.5% de NaCl). La solución de bacterias fue ajustada a una densidad óptica de 1, a 600 nm mediante espectrofotometría (Bio-Rad, Smart-Spec 300) [48].

Las concentraciones de bacteria utilizadas fueron (350, 750, 1000, 1500 y 3000 UFC/mL), estas fueron aplicadas a unidades experimentales con un volumen final de 20 L y se incubó por 72 h. La mortalidad de los organismos fue registrada cada 6 h por inspección visual en cada tanque y los cadáveres fueron retirados de las unidades, durante los periodos de retos no hubo limpieza en los tanques y la temperatura se mantuvo a 28 °C utilizando calentadores con termostato para promover la infección de *V. parahaemolyticus* IPNGS16. La  $CL_{50}$  fue determinada a las 24 h utilizando la prueba de Probit en el software SPSS v23 (IBM, Armonk) [47].

### **6.1.5 Diseño experimental**

Antes del reto los organismos fueron examinados bajo microscopio para determinar el estadio de muda basado en el grado de desarrollo de las setas en los urópodos [48]. Se utilizaron organismos en estado de intermuda (C1) y fueron colocados en tanques plásticos de 20 L a 28 °C y 35 UPS en aireación continua y se aclimataron durante 3 días antes del reto. Este experimento consistió en 24 tanques de 40 L con 20 L de agua de mar y 10 organismos cada uno. La infección experimental se realizó con una concentración de 660 UFC/mL (valor de  $CL_{50}$  a 24 h) para cada tanque, los organismos fueron expuestos con la bacteria por 72 h.



**Figura 1.** Diagrama de toma de muestras. Los rombos rojos representan las muestras para expresión de genes en hepatopáncreas ( $n=9$ ), los triángulos azules representan las muestras de ARNm-seq en hemocitos y hepatopáncreas ( $n=9$ ), los círculos verdes representan la toma de muestras para histología ( $n=5$ ), y los semicírculos negros representan la toma de muestras para bioquímica fisiológica en hemocitos, hepatopáncreas y músculo ( $n=6$ ).

## 6.2 Evaluación de lesiones histopatológicas

Los muestreos se realizaron a las 0, 12, 24, 48, y 72 h post-infección (hpi) (Figura 1). Se tomaron 5 organismos por cada tiempo de muestreo, fueron inyectados con 1 mL de solución Davidson en el hepatopáncreas y se colocaron en inmersión en la misma solución por 48 h [49].

Los organismos fueron disecados y deshidratados en una serie ascendente de etanol (70% al 100%), y finalmente aclarados con xileno al 100% e infiltrados en parafina en un procesador automático de tejidos (Leica, ASP200S). Enseguida se incluyeron en parafina líquida a 62 °C y posteriormente enfriado a -5 °C en un centro de inclusión (Leica, EG1150H). Los cortes histológicos se realizaron en un micrótopo con rotación con un espesor de 4  $\mu\text{m}$  (Leica, RM2155), los cortes fueron montados en portaobjetos. Los tejidos se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina utilizando un teñidor automático (Leica, ST5020) y posteriormente montados en resina sintética con cubreobjetos. Las muestras fueron analizadas por microscopía óptica (BX41 trilocular, Olympus América Inc.), a objetivos 40 $\times$  y 100 $\times$  (en inmersión con aceite mineral). Las imágenes fueron capturadas

utilizando un sistema digital de imágenes mediante el software Image Pro-Premier software v9.0 (Media Cybernetics Inc.).

### 6.2.1 Evaluación descriptiva

Con base en lo propuesto por [49] como definición de organismos sanos, se describieron lesiones histopatológicas observadas en el hepatopáncreas, en las diversas hpi y reportadas anteriormente, utilizando imágenes digitalizadas de 4, 10, 20, 40, y 100  $\times$  [14,16].

### 6.2.2 Evaluación semicuantitativa

Utilizando las imágenes de los tejidos y el sistema digital de imágenes (Image Pro-Premier v9, Media Cybernetics), se registraron los efectos de los daños histopatológicos causados por la AHPND como son: desprendimiento de células epiteliales, necrosis, atrofia e infiltración de hemocitos. Esto se llevó a cabo utilizando diversas áreas del hepatopáncreas, con base en la Tabla I, que consiste en otorgar un valor numérico a nivel de daño y alteraciones en el tejido de acuerdo con el nivel de afectación por la AHPND.

**Tabla I.** Guía general para dar un valor numérico cualitativo del grado de severidad al daño considerado para el hepatopáncreas [50].

<b>Grado</b>	<b>Daño o alteración</b>
0	No presenta alteración.
1	Presencia mínima de alteración.
2	Presencia media de alteración.
3	Presencia alta de alteración.

Los datos se compararon por un análisis no paramétrico de Kruskal Wallis ( $\alpha = 0.05$ ) de una vía considerando como factores los tiempos muestreados (0, 12, 24, 48 y 72 h), y las variables respuesta fueron el grado de daño (desprendimiento de células, necrosis, atrofia e infiltración de hemocitos), las muestras se evaluaron por pares en el software SPSS v23 (IBM, Armonk).

### 6.2.3 Evaluación cuantitativa

El tamaño de las células B y el área de túbulo del hepatopáncreas se determinó usando un sistema digital de imágenes con un microscopio óptico de campo claro y contraste de fases (Olympus, BX45) y una cámara fotográfica clara (Nikon Digital Sight, DS-Ri1) mediante el software Image Pro-Premier v9.0. Las mediciones se realizaron utilizando 3 secciones diferentes de cada muestra ( $n = 5$ ), la altura de la célula B (HepB) comienza de la región basal, hasta la región apical, donde se localiza el lumen. El área del túbulo se midió utilizando 3 secciones diferentes de cada muestra ( $n = 5$ ).

Los datos de la altura de las células B y el área de los túbulos, se analizaron con la prueba Saphiro-Wilks de normalidad y la homogeneidad de la varianza de Levene, los datos se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA) ( $\alpha = 0.05$ ) y una prueba *post-hoc* de Holm-Sidak ( $\alpha = 0.05$ ), para determinar diferencias significativas entre los tiempos, mediante el software Sigma-Plot v11.0 (Systat Software Inc., Alemania).

## 6.3 Análisis de indicadores bioquímicos

### 6.3.1 Toma de muestras

Para los parámetros bioquímicos, se tomaron muestras ( $n = 6$ ) provenientes de un mismo organismo de hemolinfa, músculo y hepatopáncreas, a las 0, 3, 6, 12, 24, 48 h (Figura 1). Para la muestra de hemolinfa se utilizó una jeringa de insulina de 1 mL con 100  $\mu$ L de volumen de solución anticoagulante SIC-EDTA (450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM de HEPES y oxalato de potasio al 5%), desde el seno ventral, y las muestras se colocaron en tubos de 0.7 mL en baño de hielo, posteriormente se almacenaron a  $-20$  °C. Las muestras de hepatopáncreas y músculo se obtuvieron disecando el cefalotórax y el primer segmento abdominal del músculo, los tejidos se colocaron en nitrógeno líquido para su transporte al laboratorio, y su almacenamiento a  $-80$  °C.

Las muestras individuales de hepatopáncreas y músculo fueron disecadas en una placa de metal en frío, se tomaron de 50-100 mg de tejido y se colocaron en tubos de 2 mL de polipropileno. Los tejidos (100 mg) fueron liofilizados por 16 h y pulverizados en homogeneizador de perlas metálicas de 3 mm FastPrep-40 (MP Biomedicals), por 40 s a una velocidad de 6 m/s en 1 mL de solución SIC-EDTA. Las muestras se centrifugaron a  $10,000 \times g$  por 20 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se almacenaron a -80 °C para posteriores análisis.

### **6.3.2 Glucosa**

La glucosa se cuantificó en la hemolinfa, con el método enzimático-colorimétrico de la glucosa oxidasa/peroxidasa. La técnica se fundamenta en el uso de dos reacciones acopladas catalizadas por las enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa que convierten la glucosa en orto-toluidina compuesto da una coloración rosa, proporcional a la concentración de glucosa en la muestra. El ensayo se adaptó a un formato de microplacas de 96 pozos, que empleó 20  $\mu\text{L}$  de hemolinfa y 200  $\mu\text{L}$  del reactivo (por triplicado), y la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, por 30 min. A continuación, se leyó la absorbancia a 490 nm en un lector de microplacas MultiSkan FC (ThermoFischer). Para el cálculo de la concentración de glucosa, la absorbancia de la muestra se comparó con la del patrón de glucosa (100 mg/dL). El rango de linealidad del ensayo se determinó a partir de las lecturas de la absorbancia a 490 nm obtenidas con soluciones de glucosa de diferente concentración (100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125 mg/dL) preparadas por dilución seriada a partir de una concentración de 100 mg/dL. Los datos fueron ajustados a una regresión lineal [51].

### **6.3.3 Carbohidratos totales**

Este método se evaluó en hepatopáncreas y músculo. Se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de homogenizado de cada tejido en un minitubo y se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) al 20%, se agitó y se centrifugó a  $5,000 \times g$  10 min a 5 °C. Se

recuperaron 25  $\mu\text{L}$  de sobrenadante y se colocaron en un minitubo al cual se le añadieron 250  $\mu\text{L}$  de antrona al 0.01% disuelta en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 96%. Esta mezcla se calentó a 85  $^\circ\text{C}$  por 10 min, posteriormente se colocó en un baño de hielo hasta enfriamiento, se tomó una muestra de 200  $\mu\text{L}$  y se colocaron en una microplaca, la absorbancia se leyó a 630 nm. Esta reacción se basa en que el medio ácido hidroliza los enlaces glicosídicos y los monosacáridos reaccionan con la antrona, esto da como resultado un color verde azulado. Se utilizó una curva estándar, con soluciones de glucosa de diferente concentración (100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125 mg/dL) preparadas por dilución seriada a partir de una concentración de 100 mg, a partir de aquí se calcularon las concentraciones en mg/g de peso seco [52].

#### **6.3.4 Glucógeno**

La determinación de glucógeno se realizó en hepatopáncreas y músculo. Se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de homogenizado de cada tejido en un minitubo y se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) al 20%, se agitó y se centrifugó a  $5,000 \times g$  10 min a 5  $^\circ\text{C}$ . Se recuperaron 25  $\mu\text{L}$  de sobrenadante y se colocaron en un minitubo. Para separar el glucógeno de los demás carbohidratos, este se precipitó utilizando 500  $\mu\text{L}$  de etanol frío, y se centrifugó a  $5,000 \times g$  10 min a 5  $^\circ\text{C}$ , se descartó el etanol y se dejó evaporar completamente, posteriormente el glucógeno se resuspendió en agua destilada. Para realizar la reacción y los cálculos de concentración se realizaron como se mencionó en la sección 6.3.3.

#### **6.3.5 Lactato**

Este metabolito se midió en hemolinfa y extracto de músculo (sección 6.3), utilizando el Kit Randox-Lactate (Randox, LC3980), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se colocaron en una microplaca 20  $\mu\text{L}$  de hemolinfa y del extracto de músculo de cada individuo y posteriormente se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de reactivo Randox-Lactate. La reacción se llevó en 10 min a temperatura ambiente. Esta reacción se basa en utilizar la enzima

lactato oxidasa, que forma piruvato y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), posteriormente una enzima peroxidasa convierte el  $H_2O_2$  en agua y oxígeno que reaccionan con el reactivo TOOS (N-etil-N-(2 hidroxipropil) m-toluidina), que da una coloración púrpura cuya absorbancia se lee a 540 nm. A partir de una curva estándar de concentraciones conocidas de lactato (20, 10, 5, 2.5 mg/dL), se realizaron los cálculos para hemolinfa en mg/mL y para músculo en mg/g peso seco [53].

### **6.3.6 Lípidos totales**

Se evaluaron lípidos totales en hemolinfa, hepatopáncreas y músculo. En el caso de hemolinfa se tomó una alícuota de 25  $\mu$ L, para los tejidos se tomó una alícuota del homogenizado de 25  $\mu$ L, en un minitubo. Se agregaron 250  $\mu$ L de  $H_2SO_4$  concentrado, se agitó y posteriormente se calentó a 90 °C a 10 min, se enfrió en baño de hielo. De la mezcla anterior se tomaron 20  $\mu$ L y se agregaron 200  $\mu$ L de sulfofosfovainillina, se incubó por 40 min y se leyó la absorbancia a 540 nm. Este método se basa en que el medio ácido convierte a los lípidos a iones carbonio y posteriormente estos iones reaccionan con la sulfofosfovainillina. Para el cálculo se construyó una curva con un estándar de mezcla de triglicéridos (Sigma Aldrich, 17811-1AMP), en dilución seriada (200, 100, 50, 25 y 12.5 mg/dL). La concentración de extractos de los tejidos se reportaron en mg/g (peso seco) y en hemolinfa en mg/mL [54].

### **6.3.7 Triglicéridos**

Este parámetro bioquímico fue estimado en hepatopáncreas. Se utilizó el kit Trygliceride (Randox, TR210) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se tomaron 20  $\mu$ L de hemolinfa y 20  $\mu$ L de homogenizado de cada tejido, se colocaron en una microplaca y se agregaron 200  $\mu$ L de solución reactiva del Kit-Trygliceride. Se dejó reaccionar por 20 min y posteriormente se tomó lectura de absorbancia a 570 nm. Este método se basa en la reacción de la lipoproteína lipasa (LPL) que hidroliza los triglicéridos a glicerol y ácidos grasos libres, posteriormente el glicerol se convierte en glicerol-3-fosfato con la glicerol



quinasa (GK), este producto se oxida en presencia de oxígeno ( $O_2$ ) y se forma un complejo de 4-aminoantipirín que da una coloración púrpura. Para cuantificar se elaboró una curva con un estándar de mezcla de triglicéridos (Sigma Aldrich, 17811-1AMP), en dilución seriada (200, 100, 50, 25 y 12.5 mg/dL). Las concentraciones se reportaron en mg/g peso seco [55].

### **6.3.8 Colesterol**

La concentración de colesterol fue estimada en hemolinfa con el Kit Cholesterol-Randox (Randox, CH200), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se tomaron 20  $\mu$ L de hemolinfa y se colocaron en una microplaca, y se agregaron 200  $\mu$ L de solución reactiva. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por 15 min y se leyó a 550 nm. Este método está basado en la hidrólisis enzimática y la oxidación por la formación de la quinonemina en la presencia de fenol y peroxidasa. Se realizó una curva con un estándar de colesterol (Sigma Aldrich, 47127-U), en dilución seriada (200, 100, 50, 25 y 12.5 mg/dL), a partir de esta se calculó la concentración por una regresión lineal, que se reportó en mg/mL [56].

### **6.3.9 Hemocianina**

Para este procedimiento se realizaron las mediciones antes de congelar lo especificado en la sección 6.3.1, las muestras de hemolinfa, se diluyeron 1:20 (volumen final 1 mL) con SIC-EDTA, posteriormente en una celda de cuarzo se colocó la dilución y se leyó a 335 nm, esta lectura fue registrada y posteriormente se realizaron los cálculos correspondientes utilizando el coeficiente molar de extinción de la oxi-hemocianina [57].

### **6.3.10 Proteínas totales**

Este parámetro bioquímico se midió en hepatopáncreas, músculo y hemolinfa, utilizando el método del ácido bicinconínico (BCA), se tomaron 25  $\mu$ L de homogeneizado (para tejidos)

y 25  $\mu\text{L}$  de hemolinfa, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.1 N, esto se dejó digerir durante 2 horas; se tomaron 25  $\mu\text{L}$  del digerido y se agregaron 200  $\mu\text{L}$  del reactivo de BCA, se incubó a 60 °C por 15 min y se leyó a 562 nm. Este método se basa en que las proteínas reaccionan al  $\text{Cu}^{+2}$  en medio básico reduciéndolo a  $\text{Cu}^{+1}$ , dando un color de verde a morado. Se realizó una curva estándar utilizando diluciones seriadas (100, 50, 25, 12.5 y 6.25 mg/mL) de albumina sérica bovina, para estimar la concentración se realizó una regresión lineal contra los puntos de la curva [58].

### **6.3.11 Análisis estadísticos**

Todos los análisis estadísticos se realizaron por una prueba de T-Student para evaluar diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el grupo control y el infectado para cada hora, en el software SigmaPlot v11. Para estimar previamente la normalidad de los datos se analizó con la prueba de Shapiro-Wilk ( $P < 0.05$ ).

## **6.4 Análisis de expresión diferencial**

### **6.4.1 ARNm-seq de hepatopáncreas y hemocitos**

En esta sección se utilizaron las muestras tomadas a 0 y 24 hpi del diseño experimental [6.1.5](#) (Figura 1). La extracción de ARN total se realizó utilizando el reactivo Tri-reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de ARN total fueron cuantificadas en un fluorímetro Qubit 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA), la integridad del ARN total se evaluó mediante electroforesis capilar en Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), solo las muestras con valor de RIN  $>8.5$  (número de integridad de ARN), fueron utilizadas [59]. Las muestras ( $n=9$ ) fueron concentradas en una sola muestra para los siguientes pasos. El ARNm fue aislado del ARN total utilizando perlas de Oligo d(T) y se realizó una fragmentación por 15 min a 94 °C. La primera y la segunda cadena del ARNm fragmentado se les sintetizó el ADN

complementario (ADNc) y los extremos 3'— fueron reparados y adenilados, finalmente se ligaron adaptadores a los fragmentos de ADNc para la preparación de la biblioteca.

La secuenciación de ARNm fue realizada utilizando el kit NEBNext Ultra RNA Library Prep (New England Biolabs, Ipswich, MA) de illumina siguiendo las instrucciones del fabricante. El adaptador universal fue ligado a los fragmentos de ADNc, seguido de la indexación y el enriquecimiento de la biblioteca con un número limitado de ciclos de PCR. Las bibliotecas se validaron utilizando electroforesis capilar y fueron cuantificadas en el fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA), y posteriormente utilizando RT-qPCR. Las bibliotecas generadas de las muestras (control e infectadas) fueron multiplexadas en una celda de flujo y secuenciados en el equipo illumina HiSeq 2500 (San Diego, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron secuenciadas utilizando el extremo emparejado (2×100 pb). El proceso de *'base calling'* se realizó con el software de imágenes de illumina (The HiSeq Control Software), las secuencias sin procesar fueron convertidas en archivos *.fastq* con el software *bcl2fastq v1.8.4*.

#### **6.4.2 Ensamblaje de los transcriptomas y anotación funcional**

Las secuencias sin procesar fueron recortadas y filtradas para remover adaptadores, secuencias con nucleótidos desconocidos (N) y secuencia con baja calidad ( $Q \leq 20$ ) con el software [Trimomatic v0.36](#) [60]. Las secuencias procesadas fueron ensambladas *de Novo* utilizando el software [Trinity v2.10](#) utilizando kmer 31 para la biblioteca de hepatopáncreas y para la hemocitos se utilizó kmer 25 [61]. Se utilizó como comparativo la biblioteca de hemocitos, donde la infección de AHPND se realizó por inyección ([SRR6917104](#), [SRR6917105](#)) [40].

Los transcritos generados en el ensamble se anotaron con el software [Trinotate v3.0](#) con los siguientes pasos: se buscó el marco de lectura abierta (ORF) en las secuencias de nucleótidos utilizando el software de [TransDecoder v5.0.2](#). Las secuencias de nucleótidos y las de aminoácidos fueron alineadas usando la herramienta de BLASTx y BLASTp

respectivamente con la base de datos [SwissProt](#). La base de datos SwissProt se utilizó para asignar nombres a los transcritos y a las proteínas predichas y obtener las anotaciones de KEGG, ontología génica (GO) y eggNOG [62–66]. Para identificar los dominios de proteínas se utilizó [HMMER v3.1b2](#) con la base de datos Pfam 31.0 [67,68]. Para la predicción de péptido señal y regiones transmembranales, se utilizó [SignalP v4.1](#) y [TMHMM v2.0c](#). Los resultados anteriores se compilaron en una base de datos SQLite. Los términos de GO fueron extraídos de la base y fueron convertidos a formato nativo y analizado en el sitio web WEGO 2.0.

### 6.4.3 Cuantificación de transcritos y análisis de expresión

La estimación de la abundancia de transcritos se realizó con la línea de programas de Trinity v2.10. La abundancia fue estimada con el software [Salmon v1.3.0](#) utilizando cada biblioteca para cada muestra y tejido (controles vs infectados, en hepatopáncreas y hemocitos respectivamente) [69,70]. Las matrices de expresión fueron construidas en una base de datos y se calcularon los patrones de expresión utilizando [edgeR v3.11](#), normalizando con el método TPM (transcritos por millón) y utilizando un factor de dispersión 0.1 [71–73]. El conteo de las lecturas fue normalizado para obtener la expresión relativa. Utilizamos FDR (tasa de descubrimientos falsos) para darle la significancia estadística a los genes diferencialmente expresados (DETs). Se formaron clústeres de transcritos de interés utilizando  $FDR \leq 0.01$  y  $\log_2\text{Ratio} \geq 2$ . Los clústeres de DETs fueron anotados como se mencionó anteriormente [74].

### 6.4.4 Análisis de enriquecimiento de los términos GO

Para seleccionar genes de interés de nuestros DETs se realizó un análisis de enriquecimiento utilizando la herramienta de [‘Goseq’](#) basado en una prueba hipergeométrica ( $P \leq 0.01$ ) [75]. Adicionalmente las rutas metabólicas se analizaron en el servidor [KAAS](#) (KEGG Automatic Annotation Server) [76].

#### **6.4.5 Análisis de redes de interacción proteína-proteína**

Las interacciones de los genes diferencialmente expresados fueron predichas utilizando el software de GeneMANIA, una herramienta del software Cytoscape v3.6.0 [77,78]. Los parámetros utilizados están basados en la GO utilizando procesos biológicos y se utilizó *Drosophila melanogaster* como especie fuente. Se construyeron 3 redes de interacción de las bibliotecas genómicas utilizando los genes que aumentaron y disminuyeron su expresión, las redes fueron construidas a partir de los siguientes niveles de interacción: coexpresión, interacciones físicas y genéticas, participación en rutas, colocalización de proteínas, similitud en dominios de proteínas y proteínas predichas por interacción.

#### **6.4.6 Identificación de genes eje**

Los genes ejes representan nodos en las redes con el mayor número de interacciones genéticas dentro de la red y fueron calculados utilizando el grado de distribución de nodos, utilizando las herramientas estadísticas de Cytoscape v3.6.0 [79].

### **6.5 Análisis de expresión relativa**

#### **6.5.1 Selección de genes**

Seleccionamos 10 genes basados en nuestro análisis de expresión diferencial, así como por su participación en la respuesta inmune y metabólica contra la AHPND. Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados en el software [primer3plus](#), la lista se muestra en la Tabla II. Los oligonucleótidos se sintetizaron en una escala de [25 nM] en T4Oligo (Irapuato, Guanajuato, México) y se purificaron por el método de desalado.

### 6.5.2 Análisis de estabilidad de los genes de referencia

Para analizar la estabilidad de los genes de referencia, primeramente, se amplificaron para todas las condiciones experimentales anteriormente mencionadas, el gen factor de elongación 1- $\alpha$  (*LvEF1A*), proteína ribosomal L7 (*LvRPL7*) y la proteína ribosomal L8 (*LvRPL8*). Los valores de Cq obtenidos se evaluaron en el programa en línea [RefFinder](#), para determinar cuál de los 3 genes anteriormente mencionados tenía más estabilidad, debido a que los genes de referencia pueden ser afectados por el tratamiento y para precisar los valores de expresión relativa se utiliza el más estable [80–83].

**Tabla II.** Lista de oligonucleótidos utilizados para expresión relativa.

Transcrito	Nombre	Secuencia (5'—3')	Tamaño (pb)	Eficiencia	R <sup>2</sup>	Acceso Genbank
<i>LvRPL7</i>	Proteína ribosomal L7	GCCGTGTTTCCTCTGTACTCC GAGTTCAAAGCCGTCAATATCC	161	2.01	0.98	<a href="#">JX481271.1</a>
<i>LvPCK1</i>	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	GGAGAGCAAGACCTTCATCG GTTCTTCCCTTCATGCATCC	153	2.1	0.98	<a href="#">AJ250829.1</a>
<i>LvTHBS</i>	Trombospondina	CCACAAACGGCATCTACTCC ATAGAACTTGGCATTGCTTTGG	201	1.93	0.98	<a href="#">MK033611</a>
<i>LvPRDX</i>	Peroxiredoxina	TCAACGCGGTCATTAAGG AAAGCCATGATCAGCAAACC	170	1.95	0.97	<a href="#">JN393011.1</a>
<i>LvCAS</i>	Proteína de susceptibilidad a apoptosis	TGTGCAGTTGGTCTCAGTGG TCTGGCTGATGAACCTTGG	183	1.97	0.95	<a href="#">MK033612</a>
<i>LvCLO</i>	Proteína de coagulación	AAGGTCATAAAGCAGGGTAGTCG GACCGTGAGGACAGAGAAGC	112	2.14	0.99	<a href="#">DQ984182.1</a>
<i>LvHCY</i>	Hemocianina	CAACATCGTCCACATCTTCG TTGATGCTGAACGTCTGTCC	159	1.91	0.99	<a href="#">KY695246.1</a>
<i>LvcSOD</i>	Superóxido dismutasa	GCCCCAATGAGAACAAGC AAGGCCTTACGTAATCTGC	146	1.80	0.98	<a href="#">DQ005531.1</a>
<i>LvHYO</i>	Proteína regulada por hipoxia	ATGTTTTTGGCAAGCTCTCG CACTGATTTCTGCTGCTATGG	121	1.97	0.95	<a href="#">MK033613</a>
<i>LvCTR</i>	Quimotripsina	TCTTCACTCACGAGCACTGG GGAGGACGTCCGAGATACC	192	1.89	0.98	<a href="#">X66415.1</a>
<i>LvCTSH</i>	Catepsina L	TCATCGACGACCACAACG	84	1.92	0.96	<a href="#">X85127.1</a>

### 6.5.3 Análisis de expresión relativa

Las extracciones de ARN total de hepatopáncreas se realizaron de acuerdo con la sección 6.4.1. La cantidad y la pureza se estimaron por espectrofotometría utilizando las relaciones  $A_{260\text{nm}}/280\text{nm}$  y  $A_{260\text{nm}}/230\text{nm}$  utilizando el Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Chicago, IL). La calidad del ARN se evaluó en una electroforesis de agarosa al 1.2% en hipoclorito de sodio en buffer Tris-Acetato EDTA (TAE 1X), por inspección visual de la unidad 18s y 28s del ARN ribosomal [84]. El ARN total (1  $\mu\text{g}$ ) se trató con ADNsa I grado amplificación (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la síntesis de ADNc se utilizó el sistema de transcripción reversa ImPromp II (Promega, Madison, WI), siguiendo las instrucciones del fabricante usando 0.5  $\mu\text{g}$  de Oligo d(T) para la captura de ARNm, el ADNc se almacenó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Las eficiencias de aplicación para todos los oligonucleótidos fueron estimadas utilizando el método de diluciones seriadas con 4 de estas (1:50, 1:500, 1:5000, 1:50000), iniciando con 150 ng/ $\mu\text{L}$  de ADNc y un valor de umbral para Cq de 0.034 asignado automáticamente por el software Rotor-Gene v1.7.

En todos los casos los RT-qPCR se realizaron por triplicado (réplicas técnicas) y en triplicado por réplicas biológicas, en un sistema analizador rotatorio de tiempo real Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Sídney, Australia). Las reacciones de RT-qPCR contenían los siguientes componentes de reacción: 2.5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM de dNTP, 1X de buffer sin color *GoTaq Flexi*, 1.25 U de ADN polimerasa *GoTaq Flexi* (Promega, Madison, WI), 500 nM de cada oligonucleótido, 1X de colorante EvaGreen (Biotium, Hayward, CA) y ~17 ng de ADNc (1:50) en un volumen final de reacción de 15  $\mu\text{L}$ . Las condiciones de amplificación fueron:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  (5 min), 40 ciclos de  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  (20 s),  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  (20 s)  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  (20 s) con una extensión final de  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  (5 min). La curva de disociación se realizó de  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $99\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{s}$ ).



Los cálculos de expresión relativa fueron calculados usando el método  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ , todos los datos obtenidos, tanto de muestras de grupo control e infectado fueron normalizados con muestras tomadas al tiempo cero de camarones sin ningún tratamiento. Los datos de expresión relativa fueron analizados por un análisis de varianza (ANOVA) de una vía ( $\alpha = 0.05$ ), las diferencias significativas se evaluaron con la prueba de Holm-Sidak ( $\alpha = 0.05$ ) en el software de SigmaPlot v11 (Systat Software, Inc, Germany) [85].

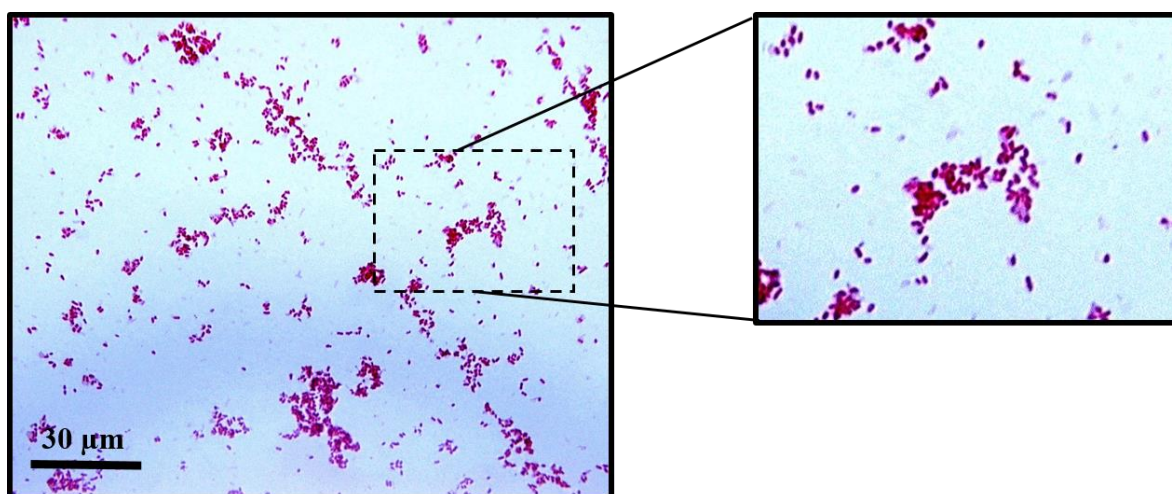
## 7. RESULTADOS

### 7.1 Caracterización de *Vibrio parahaemolyticus* IPNGS16

El crecimiento de la cepa aislada de una colonia de *V. parahaemolyticus* IPNGS16 en el medio TCBS dio como resultado, colonias verdes azuladas y sin cambio de coloración en el medio, esto significa que esta bacteria no puede fermentar sacarosa, ni lactosa [86].

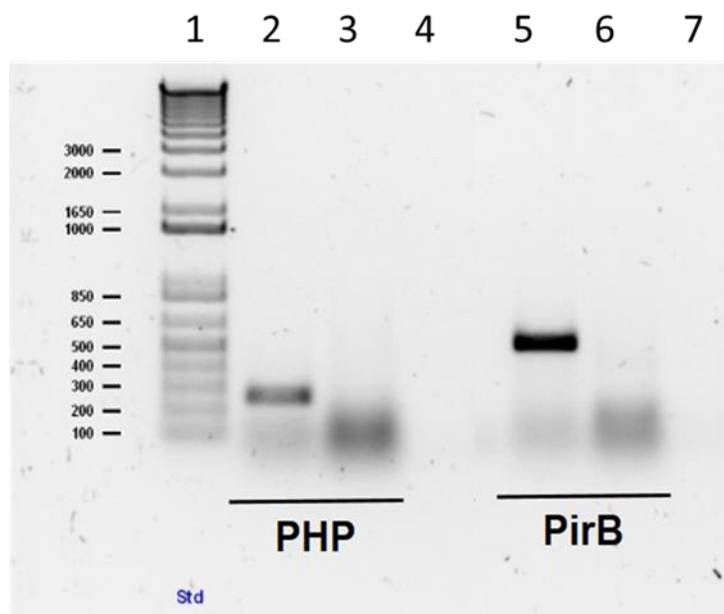
#### 7.1.1 Tinción Gram y caracterización molecular de virulencia

Mediante el uso de la tinción Gram, se identificó la morfología y el tipo de pared celular de la cepa de *V. parahaemolyticus* IPNGS16, lo cual resultó en una pared celular tipo Gram (-) y una morfología curvada bacilar (Figura 2).



**Figura 2.** Micrografía de *Vibrio parahaemolyticus* IPNGS16 con tinción Gram con un objetivo de 100×, en inmersión con aceite mineral.

Para determinar si esta cepa de *V. parahaemolyticus* IPNGS16 contenía el plásmido reportado pVPAV-3 (causante de la AHPND), se amplificaron 2 regiones: una del gen *PHP* y otra del gen *PirB* por PCR punto final; se utilizó como control negativo *V. parahaemolyticus* CAIM-170 (donado por el Dr. Bruno Gómez Gil, CIAD, Mazatlán, Sinaloa). En la Figura 3 reportamos la electroforesis de agarosa [87].

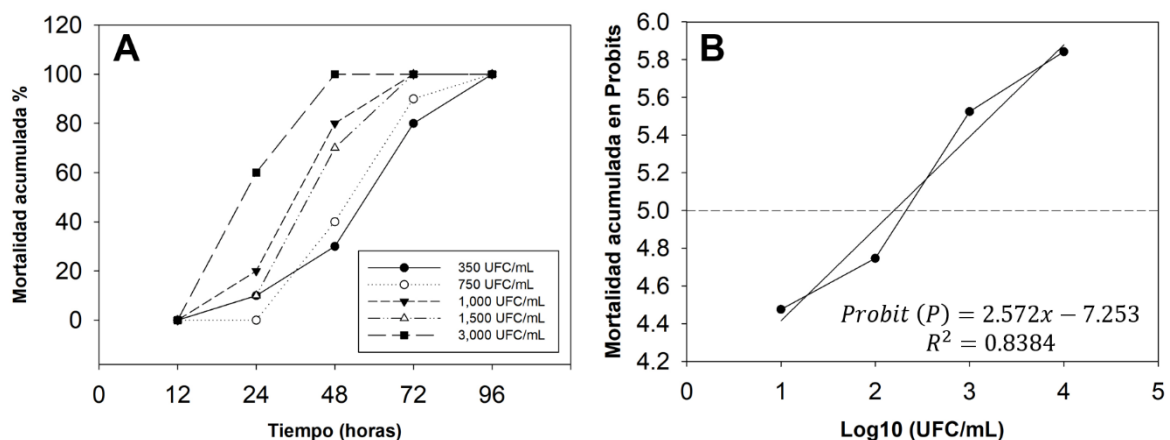


**Figura 3.** Productos de PCR de los genes *PHP* y *PirB* que demuestran la presencia del plásmido pVPAV-3 en la cepa de *Vibrio parahaemolyticus* IPNGS16. Se muestra un gel de electroforesis de agarosa al 1%. Carril 1: marcador de peso molecular (1 kb plus). Carriles 2 y 5: ADNg de la cepa *V. parahaemolyticus* IPNGS16. Carriles 3 y 6: ADNg la cepa de *V. parahaemolyticus* CAIM170, que no contiene el plásmido pVPAV-3. Carriles 4 y 7: control negativo (agua desionizada).

### 7.1.2 Determinación de la concentración letal media ( $CL_{50}$ )

Los datos utilizados para la  $CL_{50}$  fueron los datos de las mortalidades acumuladas a las 24 h post infección. La Figura 4A, muestra los datos de las mortalidades acumuladas en el experimento donde se observa una relación directa de la concentración celular contra la respuesta (mortalidad acumulada).

La estimación de la  $CL_{50}$  fue 660.95 UFC/mL con un intervalo de confianza al 95% de 362.81 - 950.041 UFC/mL. En la Figura 4B se muestra la regresión lineal utilizando máxima verosimilitud en Probits para la estimación de la  $CL_{50}$  ( $\alpha = 0.001$ ). La prueba de bondad de ajuste de *Pearson* dio como resultado  $\chi^2=1.954$  con 3 grados de libertad y con una significancia de 0.582.



**Figura 4.** Determinación de la CL<sub>50</sub> de *Vibrio parahaemolyticus* IPNGS16 en *Litopenaeus vannamei* suministrado por inmersión. A) Mortalidad acumulada vs el tiempo a distintas concentraciones de *V. parahaemolyticus* IPNGS16. B) Mortalidad acumulada en Probits vs el Log<sub>10</sub> de la concentración de bacterias a las 24 h.

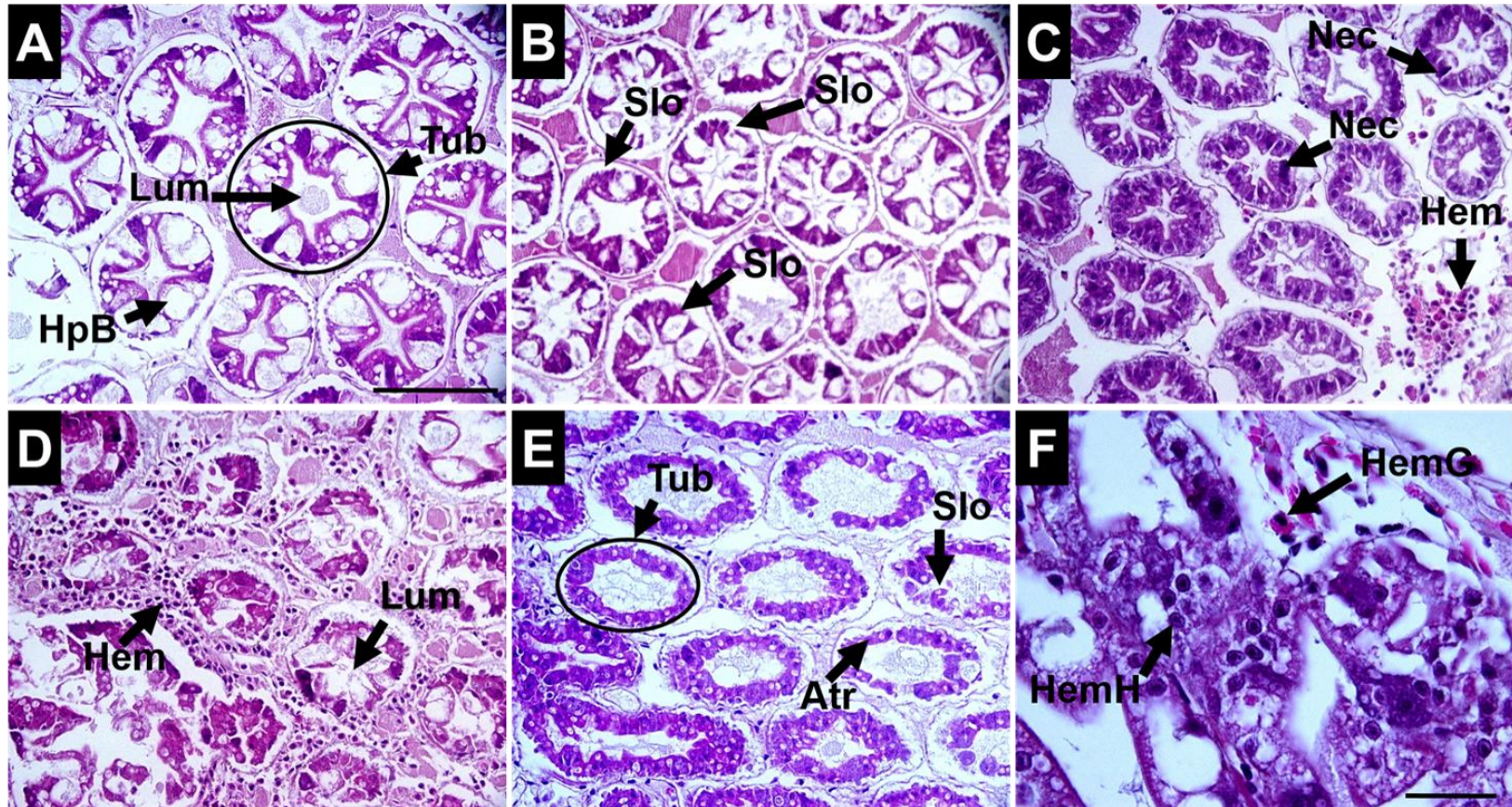
## 7.2 Evaluación de lesiones histopatológicas

Se llevaron a cabo distintas evaluaciones: 1) evaluación descriptiva para identificar signos reportados en la literatura; 2) evaluación semicuantitativa para entender el progreso de las lesiones y; 3) evaluación cuantitativa para identificar los cambios que sufren los organismos durante la AHPND.

### 7.2.1 Evaluación descriptiva

La Figura 5 muestra de manera progresiva el efecto de la infección de *V. parahaemolyticus* IPNGS16: desprendimiento de células (Slo), atrofia celular (Atr), necrosis (Nec) e infiltración de hemocitos (Hem). En la Figura 5A se observa el hepatopáncreas (Hep) sano a las 0 h de infección, se ven claramente definidas las células B (Hpb) y sus áreas vacuolares. Las flechas indican desprendimiento de células a las 12 horas post-infección (Slo) (Figura 5B). Las flechas indican células picnóticas en estado de necrosis a las 24 horas post infección (Figura 5C).

El colapso de los túbulos, atrofia del lumen (Lum) e infiltración de hemocitos se observó a las 48 h post-infección (Figura 5D). El lumen de los túbulos (Tub) se encuentra atrofiado a las 48 h post-infección (Figura 5E). La Figura 5F muestra infiltración de hemocitos granulares (HemG) y hialinos (HemH), así como, células necróticas

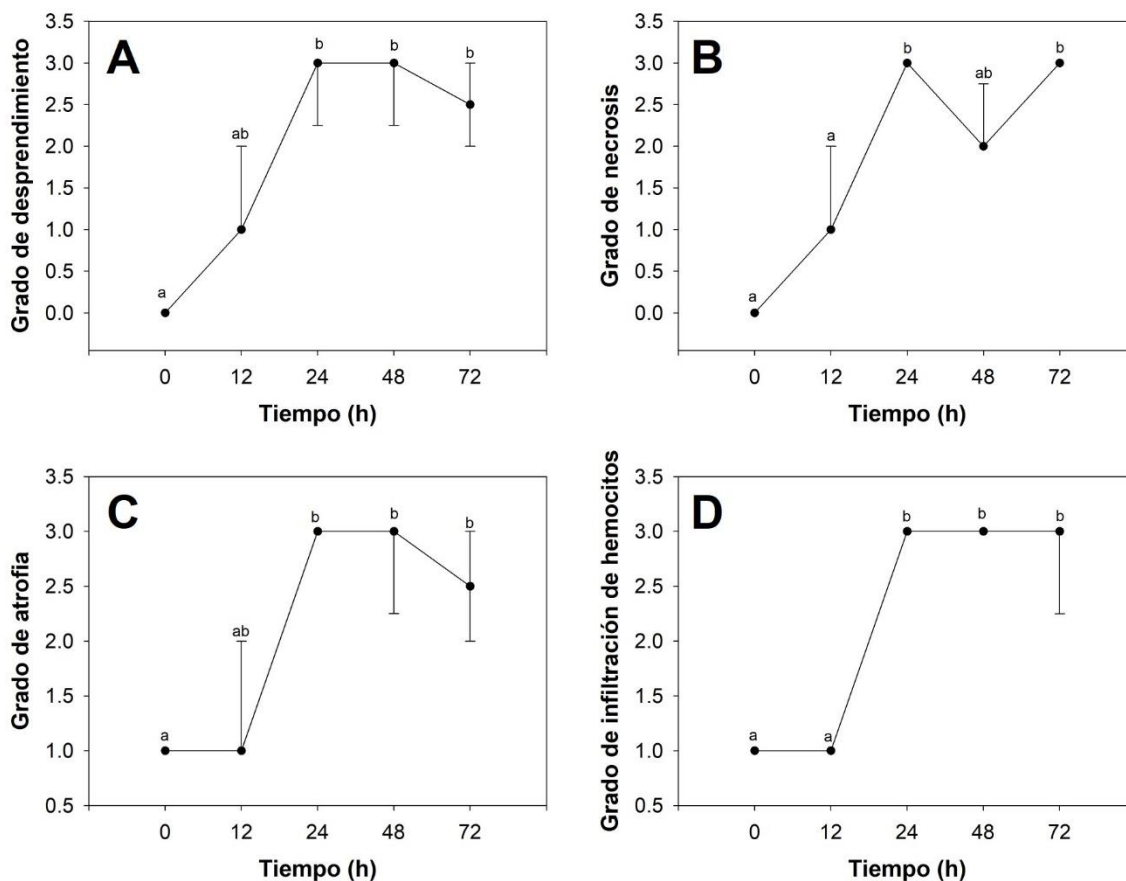


**Figura 5.** Micrografía del hepatopáncreas (Hep) de *Litopenaeus vannamei* a diferentes tiempos de exposición con *Vibrio parahaemolyticus* IPNGS16. A) 0 hpi, *L. vannamei* con células B (HpB). B) 12 hpi, las flechas muestran espacios en blanco de células desprendidas (Slo). C) 24 hpi, las flechas indican células picnóticas en estado de necrosis (Nec). D) 48 hpi, lumen (Lum), infiltración de hemocitos (Hem). E) 72 hpi, túbulos (Tub) atrofiados (Atr). F) 72 hpi, hemocito granular (HemG), hemocito hialino (HemH). Cortes longitudinales 4  $\mu$ m en parafina, tinción hematoxilina y eosina. Barra de escala: 100  $\mu$ m (A–E) y 30  $\mu$ m (F)

### 7.2.2 Evaluación semicuantitativa

Los signos característicos de la AHPND fueron evaluados de forma semicuantitativa como se describió en la Tabla I. En la Figura 6 se muestran los signos graficados contra las hpi. En todos los tiempos vemos un aumento significativo de la aparición de las lesiones en comparación al control (tiempo 0 hpi).

La Figura 6A muestra el análisis del desprendimiento de células epiteliales del hepatopáncreas. A las 0 hpi no se observó el desprendimiento, este se detectó después de las 12 hpi, mientras que a las 24 hpi, fue de manera significativa. La necrosis se detectó a las 12 hpi y fue en aumento hasta las 72 hpi, se encontraron diferencias significativas (Figura 6B). La atrofia se detectó a las 0 hpi, y aumentó de manera significativa de las 12 a 24 hpi (Figura 6C). La infiltración de hemocitos desde las 0 hpi, y se encontraron diferencias significativas con respecto al control a las 24, 48 y 72 hpi (Figura 6D).



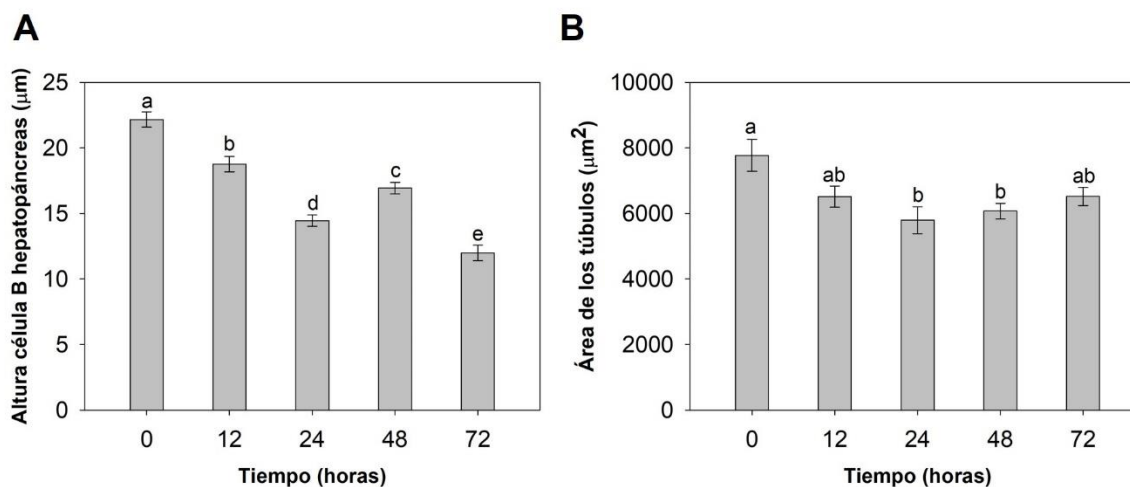
**Figura 6.** Evaluación cuantitativa de los signos de la AHPND en el hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei* a diferentes tiempos de exposición con *Vibrio parahaemolyticus*. A) Grado de desprendimiento celular. B) Grado de necrosis. C) Grado de atrofia. D) Grado de infiltración de hemocitos. Los puntos representan las medianas, la barra de error superior representa el cuartil  $Q_3$  y la inferior el cuartil  $Q_1$ . Las letras minúsculas las diferencias significativas entre los tiempos de cada parámetro evaluados por la prueba de Kruskal Wallis ( $\alpha = 0.05$ ) para todas las muestras.

### 7.2.3 Evaluación cuantitativa

La evaluación cuantitativa se realizó midiendo la altura de las células B (HpB) y el área del túbulo. La altura de las células HpB (Figura 7A) cambió a las 0, 12, y 24 hpi con tendencia a perder altura, y aumenta a las 48 hpi, finalmente a las 72 hpi se observa disminución de la altura. El área del túbulo (Figura 7B) decrece a las 0 y a las 12 hpi, pero no de manera



significativa, hasta las 24 hpi esta se mantiene. Se observa un incremento del área (sin significancia) a las 48 y 72 hpi.

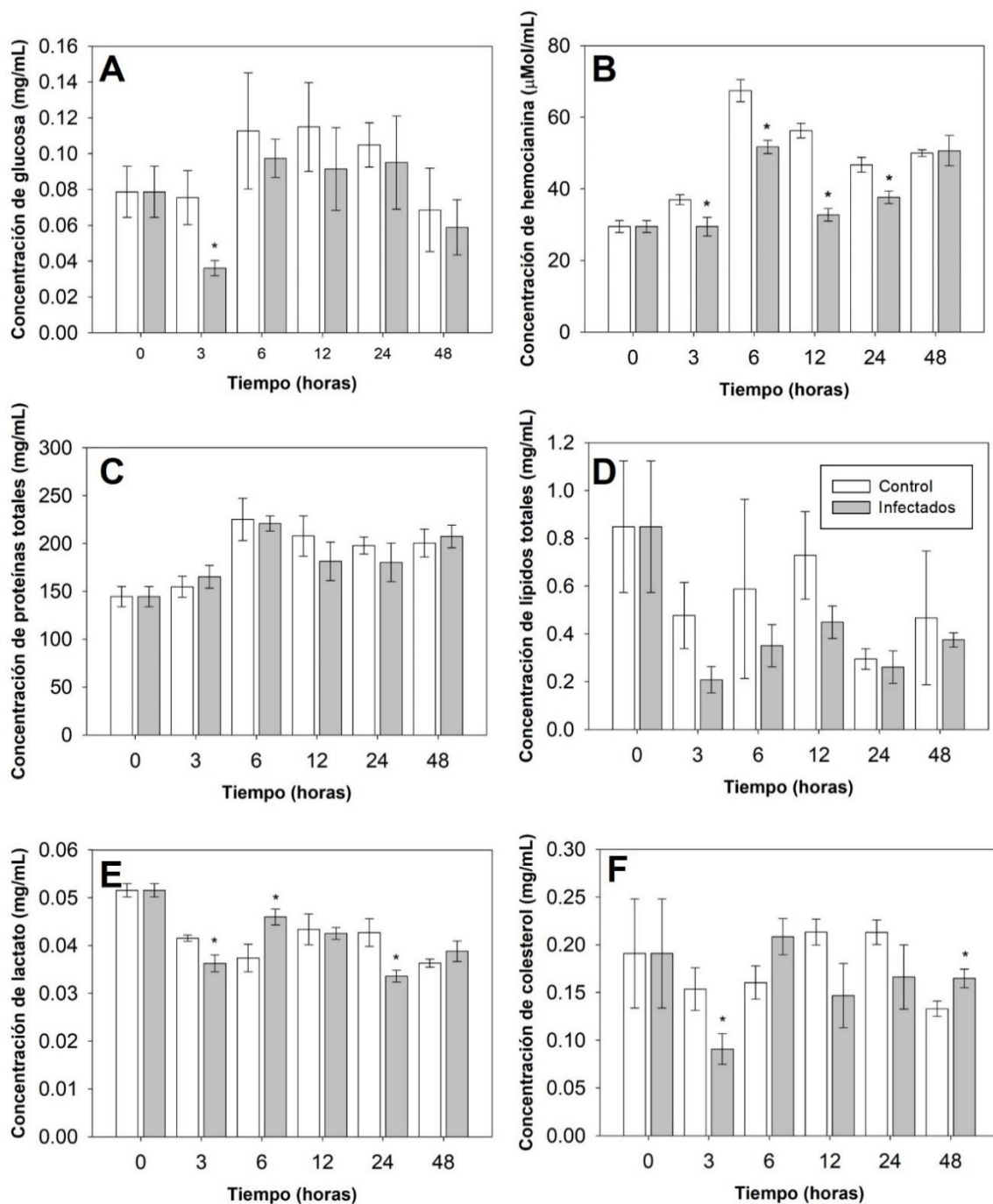


**Figura 7.** Evaluación cuantitativa del efecto de la AHPND en hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei* a diferentes tiempos de exposición con *Vibrio parahaemolyticus*. A) Altura de las células B ( $n = 5$ ). B) Área de los túbulos ( $n = 5$ ). Las barras representan la media y las barras de error representan el error estándar. Las letras minúsculas sobre las barras representan las diferencias significativas de la prueba ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) y la prueba Holm-Sidak ( $\alpha = 0.05$ )

### 7.3 Indicadores bioquímicos

#### 7.3.1 Indicadores bioquímicos en hemolinfa

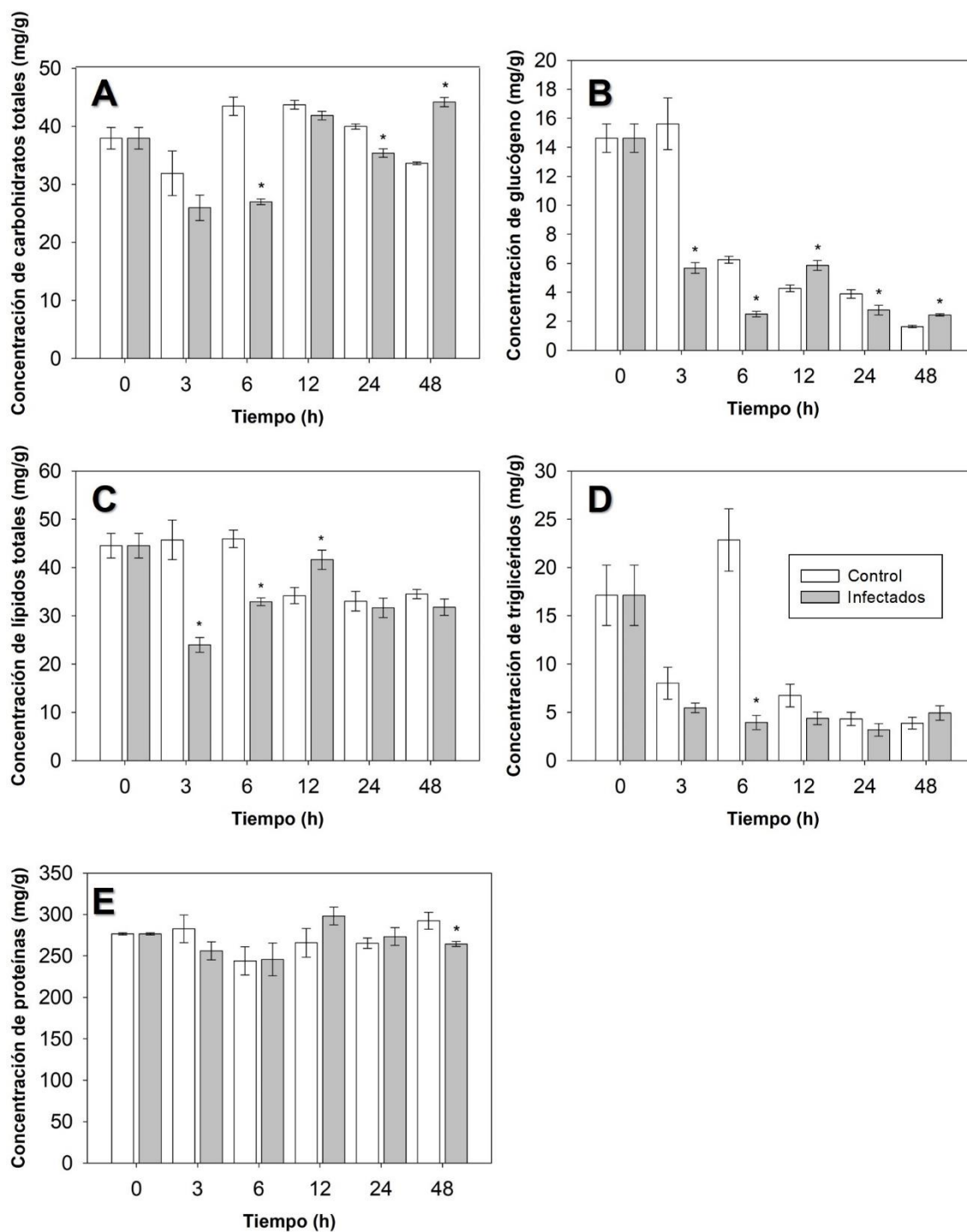
En la medición de los parámetros bioquímicos se tomó como control aquellas muestras no infectadas con *V. parahaemolyticus* para cada tiempo. En hemolinfa (Figura 8), la concentración de las proteínas y lípidos totales no tuvieron diferencias significativas (Figura 8C y 8D). La concentración de glucosa disminuyó significativamente a las 3 hpi, mientras que en los otros tiempos no se observaron cambios (Figura 8A). La concentración de hemocianina disminuyó significativamente a las 3, 6, 12 y 24 hpi (Figura 8B). La concentración de lactato disminuyó a las 3 y 24 hpi, y aumentó a las 6 hpi (Figura 8E). La concentración de colesterol disminuyó a las 3 hpi y aumentó a las 48 hpi.



**Figura 8.** Parámetros bioquímicos en hemolinfa post-infección. A) Concentración de glucosa. B) Concentración de hemocianina. C) Concentración de proteínas totales. D) Concentración de lípidos totales. E) Concentración de lactato. F) Concentración de colesterol. Las barras indican la media aritmética y error estándar ( $n = 6$ ). Los asteriscos indican diferencias significativas (T-Student) entre cada tiempo evaluado control e infectados por cada hora ( $\alpha = 0.05$ ).

### 7.3.2 Indicadores bioquímicos en hepatopáncreas

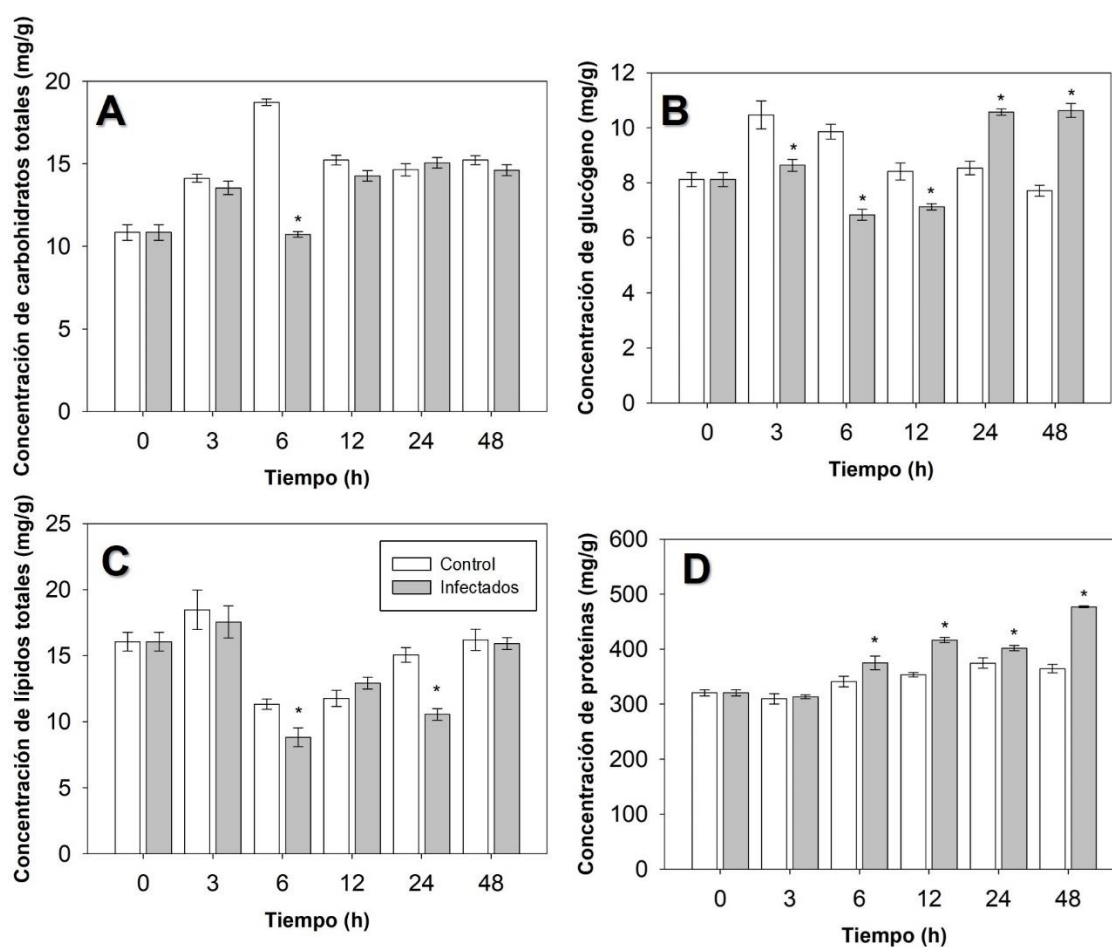
Los parámetros bioquímicos de hepatopáncreas se muestran en la Figura 9. La concentración de carbohidratos totales disminuyó a las 6, 24 hpi e incrementó a las 48 hpi (Figura 9A). La concentración de glucógeno fue menor en camarones con AHPND, respecto al control a las 3, 6 hpi, mientras que el efecto opuesto fue observado a las 48 hpi (Figura 9B). Por otro lado, esta variable disminuyó con el tiempo para ambas condiciones con respecto a las 0 hpi, aunque esta variación no fue analizada estadísticamente. La concentración de lípidos totales disminuyó significativamente a las 3, 6 hpi e incrementó a las 12 hpi (Figura 9C). La concentración de triglicéridos disminuyó a las 6 hpi, en los otros tiempos no se observaron diferencias significativas (Figura 9D). La concentración de proteínas totales disminuyó a las 48 hpi, mientras que en los otros tiempos no se observaron diferencias significativas (Figura 9E).



**Figura 9.** Indicadores bioquímicos en hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei* expuestos con *Vibrio parahaemolyticus* a diferentes tiempos. A) Concentración de carbohidratos totales. B) Concentración de glucógeno. C) Concentración de lípidos totales. D) Concentración de triglicéridos. E) Concentración de proteínas totales. Las barras indican la media aritmética y error estándar ( $n = 6$ ). Los asteriscos indican diferencias significativas (T-Student) entre cada tiempo evaluado control e infectados por cada hora ( $\alpha = 0.05$ ).

### 7.3.3 Indicadores bioquímicos en músculo

La concentración de carbohidratos totales disminuyó únicamente a las 6 hpi (Figura 10A). La concentración de glucógeno disminuyó a las 3, 6, 12, 24 y 48 hpi (Figura 10B). La concentración de lípidos totales disminuyó a las 6, 24 hpi y en otros tiempos no se encontraron cambios significativos (Figura 10C). La concentración de proteínas totales aumentó significativamente a las 12, 24, 48 hpi, y en los otros tiempos no se encontraron cambios significativos (Figura 10D).



**Figura 10.** Parámetros bioquímicos en músculo de *Litopenaeus vannamei* expuestos a *Vibrio parahaemolyticus* a diferentes tiempos. A) Concentración de carbohidratos totales. B) Concentración de glucógeno. C) Concentración de lípidos totales. D) Concentración de proteínas totales. Las barras indican la media aritmética y error estándar ( $n = 6$ ). Los asteriscos indican diferencias significativas (T-Student) entre cada tiempo evaluado control e infectados por cada hora ( $\alpha = 0.05$ ).

## 7.4 Análisis de expresión diferencial

### 7.4.1 Ensamblaje y anotación funcional

Se ensamblaron en total 6 bibliotecas de lecturas secuenciadas en la plataforma de illumina: dos de hepatopáncreas y dos de hemocitos que corresponden a este trabajo experimental, así como, lo ya publicado (Tabla III), con el fin de realizar un análisis comparativo [40].

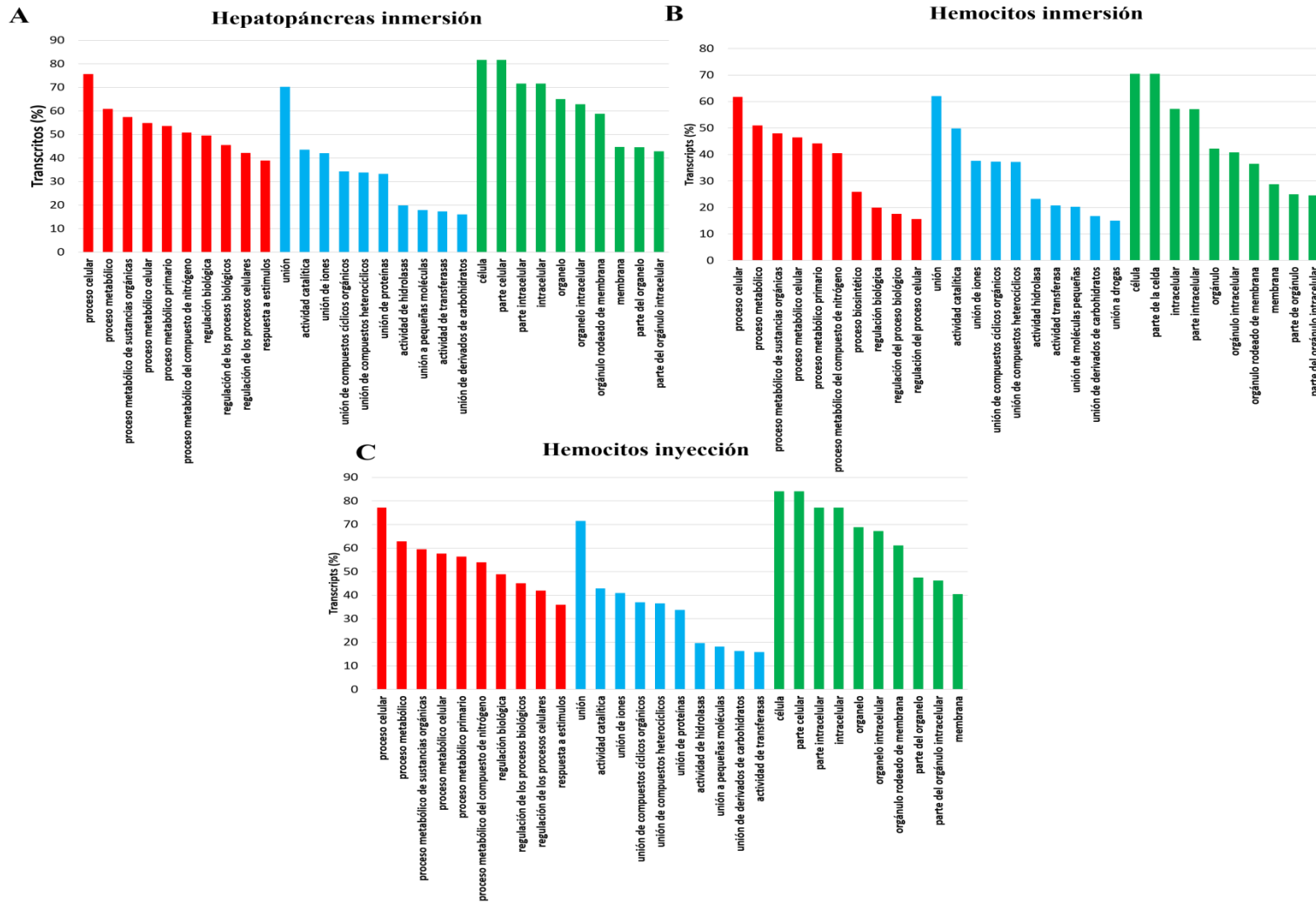
**Tabla III.** Resumen de estadísticas de las tres bibliotecas ensambladas. Hemocitos inyección corresponde a la biblioteca publicada [40].

Análisis	Hepatopáncreas	Hemocitos inmersión	Hemocitos inyección
Numero de transcritos	174,098	107,161	91,161
Contenido de GC (%)	44.36	45.01	42.93
Transcritos N <sub>10</sub>	5,513	5,847	7,247
Transcritos N <sub>50</sub>	1,961	1,779	2,695
Transcrito más largo (pb)	16,189	33,096	25,904
Transcrito más corto (pb)	201	181	185
Mediana de longitud del transcrito	455	288	512
Promedio de longitud del transcrito	984.07	728.80	1237.44
> 10 kpb	3,483	2,228	3,781
> 5 kpb	3,152	1,853	2,457
Total de bases ensambladas	171,324,032	102,473,664	112,806,441
Total de transcritos con ORF	149,923	87,211	84,511
Blastx hits vs SwissProt	31,092	82,697	6,565
BlastP vs SwissProt	44,319	29,954	25,935
Blastx hits vs genoma <sup>1</sup>	150,117	77,025	85,387
Blastp hits vs genoma <sup>1</sup>	61,840	29,457	33,364
Proteínas predichas con dominio Pfam	40,066	26,605	23,863
Péptido señal	10,586	5,080	5,976
Región transmembranal	32,366	14,681	17,021
Resultados EggNOG	532	11,982	180
Resultados de KEGG	52,618	67,703	25,635
Anotaciones GO	74,022	108,404	31,874
Anotaciones GO basadas en Pfam	26,208	16,974	15,716

<sup>1</sup>Genoma de camarón blanco *L. vannamei*

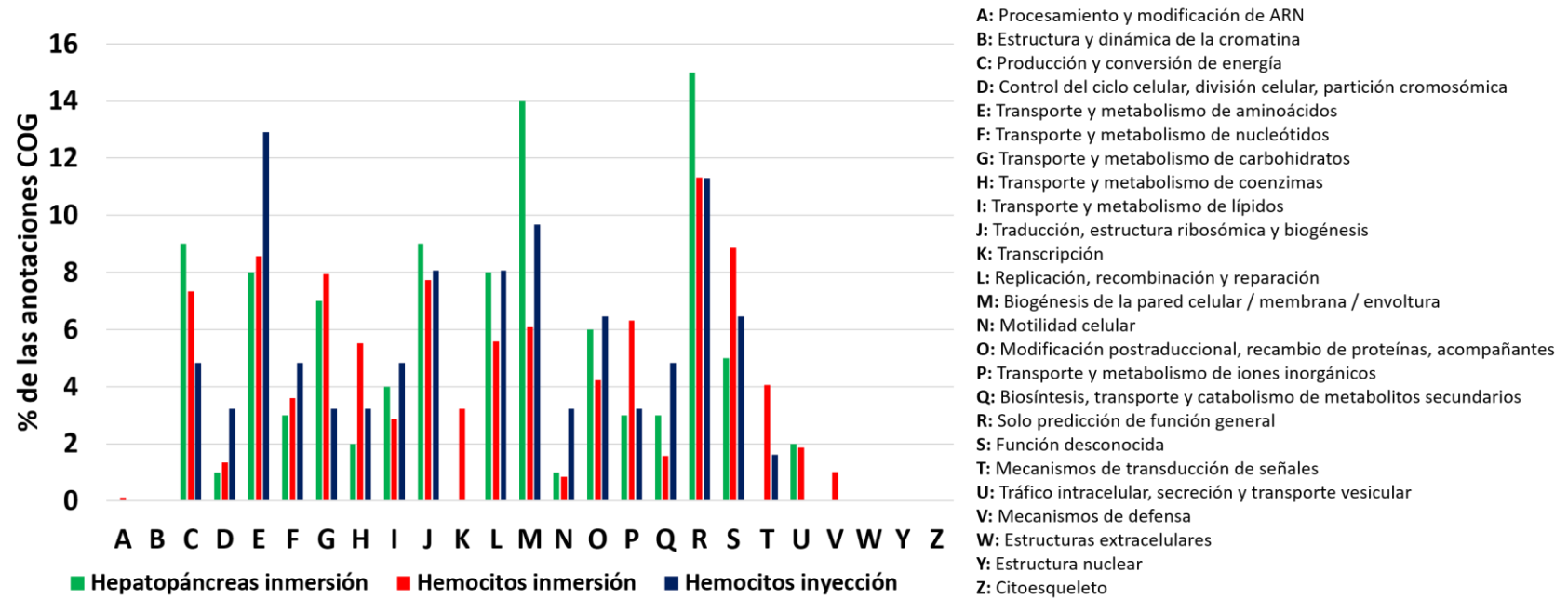
Las anotaciones de la GO en las tres bibliotecas se observó un alto contenido de términos en común (Fig. 11), donde en los procesos biológicos (BP) y función molecular (MF) fueron idénticos, aunque en la cantidad de transcritos existe una variación. En el componente celular (CC) hubo variación de los términos.

Las anotaciones de la base de datos eggNOG sirven para establecer relaciones de ortologías y las historias evolutivas de los genes y de sus funciones, en este caso los datos obtenidos de la anotación se agruparon en categorías funcionales (funcats), y fueron graficados para las 3 bibliotecas (Fig. 12).



**Figura 11.** Anotación de GO de las bibliotecas ensambladas de *Litopenaeus vannamei* de diferentes tejidos. A) Biblioteca de hepatopáncreas por inmersión. B) Hemocitos por inmersión. C) Hemocitos inyección que corresponden a los datos ya publicados [40].





**Figura 12.** Porcentaje de Anotaciones COG. Se muestra el porcentaje de las funciones ortólogas de las 3 bibliotecas ensambladas y anotadas con el protocolo de Trinotate.

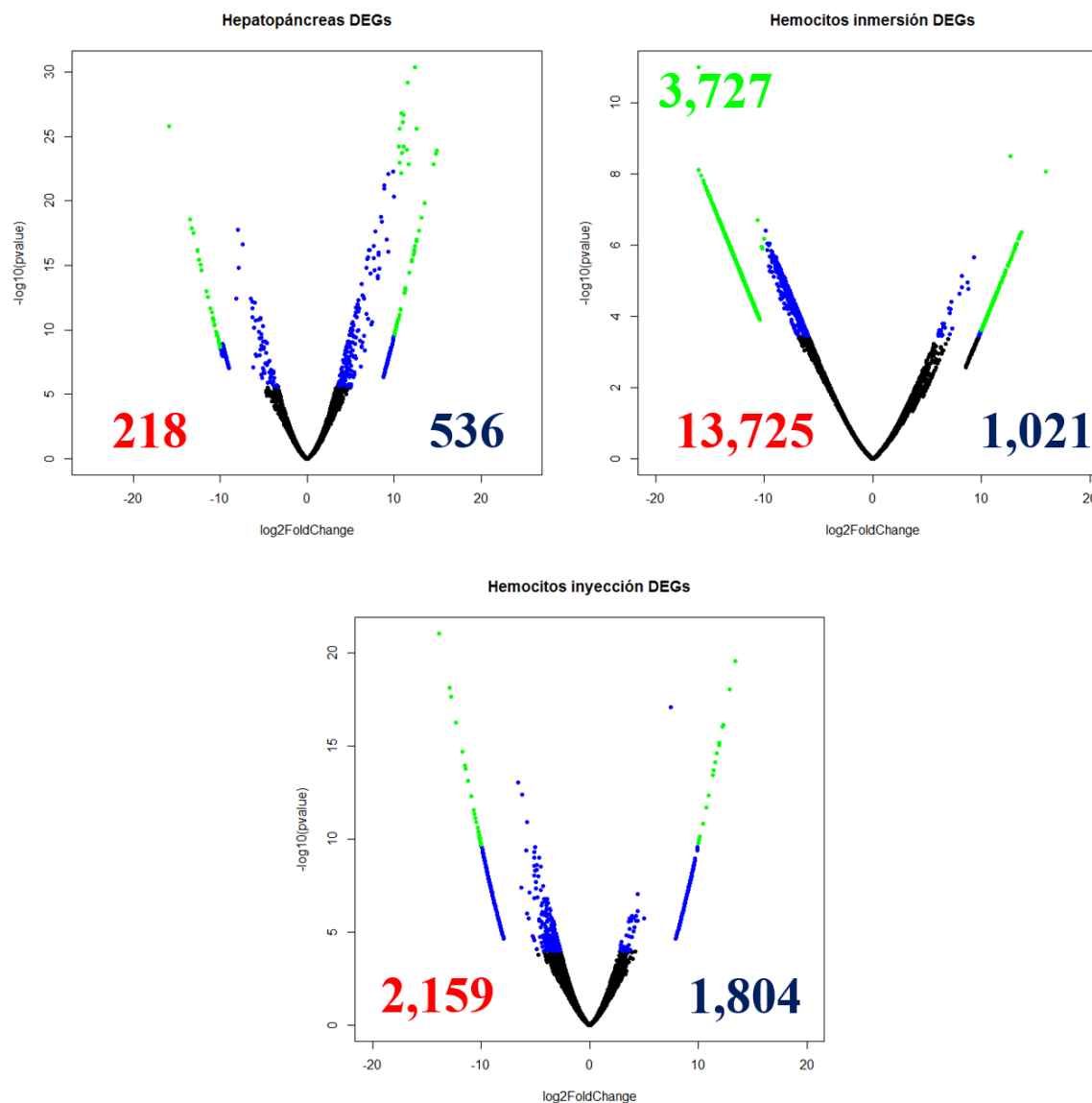
### 7.4.2 Análisis de expresión diferencial

Este análisis, resume los genes que aumentan y disminuyen su expresión mostrados en un gráfico de volcán (Figura 11) dónde se muestra el  $\log(\text{FC}^1)$  vs el  $-\log_{10}(\text{pValue})$ , esto sirve para contextualizar la tasa de cambio (FC) y la probabilidad (FDR) identificando visualmente los cambios en los transcritos analizados. Para la biblioteca de ya publicada (hemocitos inyección) se obtuvieron 1,804 genes que aumentaron su expresión y 2,159 que disminuyeron su expresión [40]. Para la biblioteca de hepatopáncreas se obtuvieron 536 genes que aumentaron su expresión y 218 que disminuyeron. Para la biblioteca de hemocitos se obtuvieron 1,021 genes que aumentaron su expresión y 13,725 que disminuyeron, a este último análisis se le aplicó un umbral de  $\log(\text{FC})$  de 11 y el valor de  $\text{FDR} \leq 0.001$ , quedando un total de 3,727 genes, para visualizar el análisis con mayor significancia.

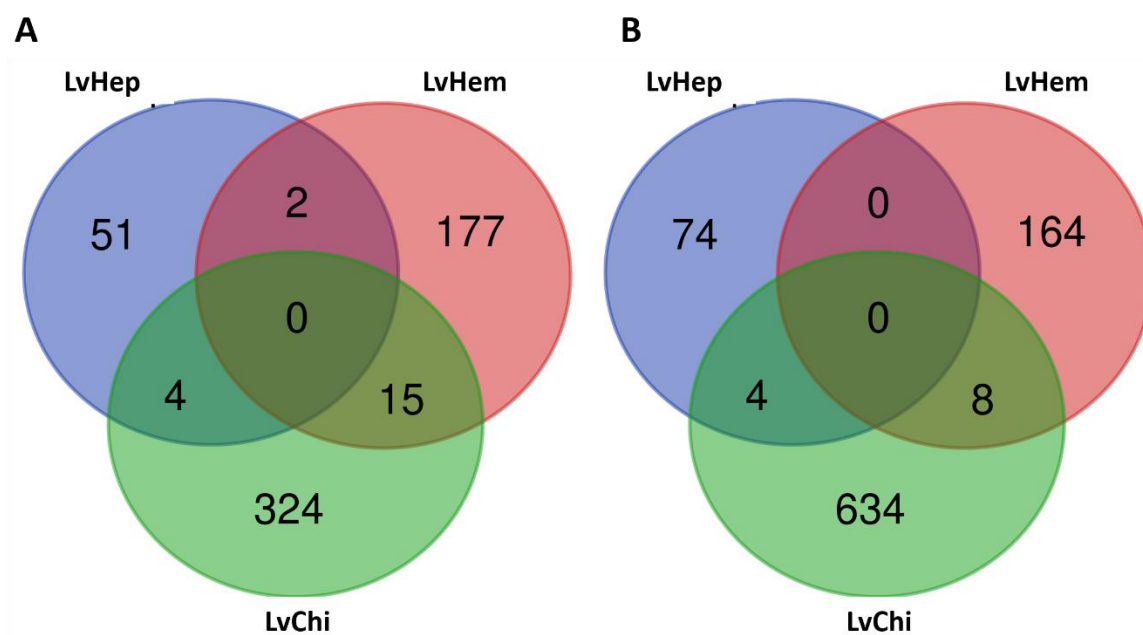
La anotación funcional de los genes que aumentaron (AE) y disminuyeron su expresión (DE) mediante el algoritmo de BLASTx, reveló que entre las bibliotecas de hemocitos y hepatopáncreas por inmersión había dos genes en común, mientras que por inmersión se encontraron 4 genes en común. En los datos de las bibliotecas de hemocitos se encontró, 15 genes (Fig. 14A y Tabla IV). Para los genes DE entre hemocitos inyección y hepatopáncreas inmersión se encontraron 4 en común, mientras que en hemocitos inmersión y hemocitos inyección fueron 8 (Fig. 14B).

---

<sup>1</sup> *Fold change*, tasa de cambio de expresión.



**Figura 13.** Gráficas de volcán de los genes expresados diferencialmente (DEGs) en las 3 bibliotecas de *Litopenaeus vannamei* analizadas. El eje de las  $x$   $\log_2$  (FC) y el de las  $y$   $-\log_{10}(\text{pValue})$ . El color negro representa los genes que no tuvieron cambios significativos, el azul representa  $\text{FDR} \leq 0.001$  y tasa de cambio  $\log_2 \geq 2$ ,  $\text{FDR} \leq 0.001$  y tasa de cambio  $\log_2 \geq 10$ . Los números en rojo representan el número de genes que disminuyeron su expresión y los números de azul oscuro representan aquellos que aumentaron su expresión. Los números color verde representan aquellos que su tasa de cambio  $\log_2 \geq 11$ .



**Figura 14.** Diagrama de Venn de los resultados de genes de *Litopenaeus vannamei* alineados con el algoritmo BLASTx con la base de datos del genoma. A) Genes que aumentaron su expresión. B) Genes que disminuyeron su expresión. LvHep representa hepatopáncreas inmersión, LvHem representa hemocitos inmersión y LvChi representa hemocitos inyección [40].

**Tabla IV.** Resultados del diagrama de Venn de genes que aumentaron su expresión. LvHep representa hepatopáncreas inmersión, LvHem representa hemocitos inmersión y LvChi representa hemocitos inyección [40]. El total representa los genes que coincidieron en los análisis, posteriormente el nombre y acceso para la base de datos del NCBI.

Biblioteca	Total	Nombre	Acceso NCBI
<b>LvHep vs. LvHem</b>	2	✓ Cathepsina L	<a href="#">XP_027234221.1</a>
		✓ Proteína ribosomal 60S L37	<a href="#">XP_027207015.1</a>
<b>LvHep vs. LvChi</b>	4	✓ Proteína sin caracterizar	<a href="#">XP_027227066.1</a>
		✓ Proteína asociada a la clasificación de proteínas vacuolares	<a href="#">XP_027209704.1</a>
		✓ Proteína similar a la titina	<a href="#">XP_027210169.1</a>
		✓ Proteína de matriz repetitiva Ser/Arg tipo 2	<a href="#">XP_027225813.1</a>
<b>LvHem vs LvChi</b>	15	✓ S-adenosilmetionina sintasa	<a href="#">XP_027210584.1</a>
		✓ Proteína sin caracterizar	<a href="#">XP_027221561.1</a>
		✓ Fosfatidilinositol 4-fosfatasa 5-quinasa tipo 1β	<a href="#">XP_027221561.1</a>
		✓ Proteína ribosomal 60s L10	<a href="#">XP_027221561.1</a>
		✓ Hemolectina	<a href="#">XP_027232720.1</a>
		✓ Proteína hemocítica glutamina γ-glutamyltransferasa	<a href="#">XP_027232462.1</a>
		✓ Granzima C	<a href="#">XP_027227579.1</a>
		✓ Proteína de unión al daño del ADN	<a href="#">XP_027219325.1</a>
		✓ Proteína sin caracterizar	<a href="#">XP_027238655.1</a>
		✓ Proteína de dedos de zinc	<a href="#">XP_027238911.1</a>
		✓ Transportador monocaboxilato 12	<a href="#">XP_027227770.1</a>
		✓ ATP sintasa subunidad β	<a href="#">XP_027238350.1</a>
		✓ Tubulina 1-α	<a href="#">XP_027238350.1</a>
		✓ ATPsa N2B	<a href="#">XP_027216812.1</a>
		✓ Poli-ubiquitna-C	<a href="#">XP_027225862.1</a>

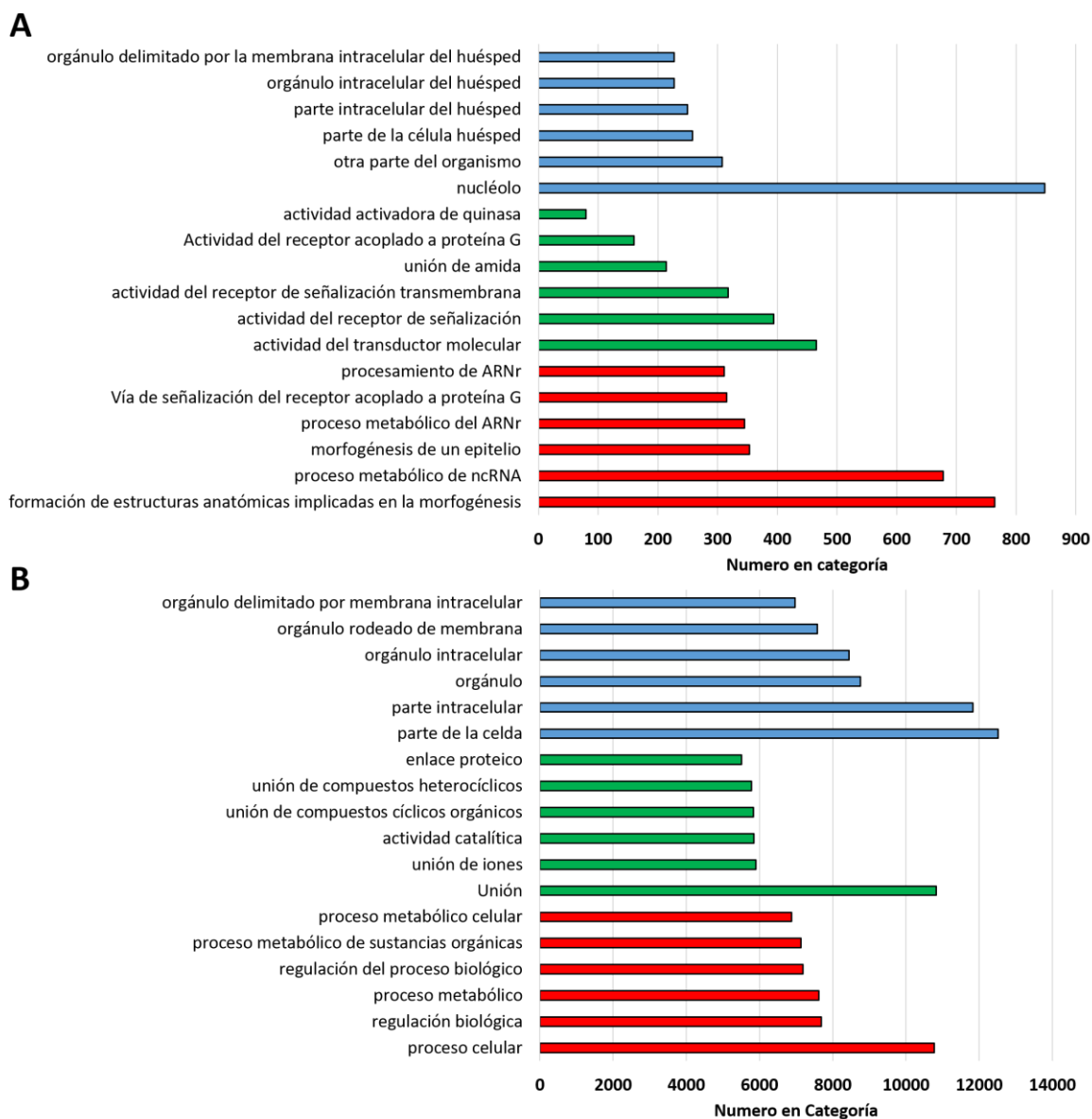
### 7.4.3 Análisis de enriquecimiento GO y rutas metabólicas KEGG

Las anotaciones de GO fueron analizadas mediante una prueba hipergeométrica para observar el enriquecimiento de términos para procesos biológicos (PB), funciones moleculares (FM) y componentes celulares (CC). En el análisis de la biblioteca de hepatopáncreas inmersión en los PB se encontraron genes AE de diferenciación celular, transporte de iones y procesos del sistema. En las FM se encontraron genes con actividad transportadora, actividad del transportador transmembranal y actividad de iones transmembranales. Para CC, se identificaron genes de la membrana plasmática, parte de la región extracelular y región extracelular (Fig. 15A). En los genes que DE, se encontró en los PB genes de regulación negativa del proceso metabólico de las proteínas, regulación de la respuesta a estímulos externos y regulación negativa del proceso de modificación de proteínas. Las funciones moleculares: unión a iones de metales de transición, actividad transportadora, unión a iones de zinc. Los componentes celulares: región extracelular, complejo de factores de transcripción (Fig. 15B).

En la biblioteca de hemocitos inmersión en los genes que aumentaron la expresión se encontraron términos de procesos biológicos: formación de estructuras anatómicas implicadas en la morfogénesis, proceso metabólico de ARN no codificante, morfogénesis de epitelio. Para las funciones moleculares: actividad del transductor molecular, actividad del receptor de señalización y actividad del receptor de señalización transmembranal. En los componentes celulares: nucléolo, otra parte del organismo, y parte de la célula huésped (Fig. 16A). En los genes que disminuyeron su expresión, para procesos biológicos: proceso celular, regulación biológica y procesos metabólicos. Para funciones moleculares: unión, unión a iones y actividad catalítica. Para componente celulares: parte de la célula, parte intracelular y orgánulo (Fig. 16B).

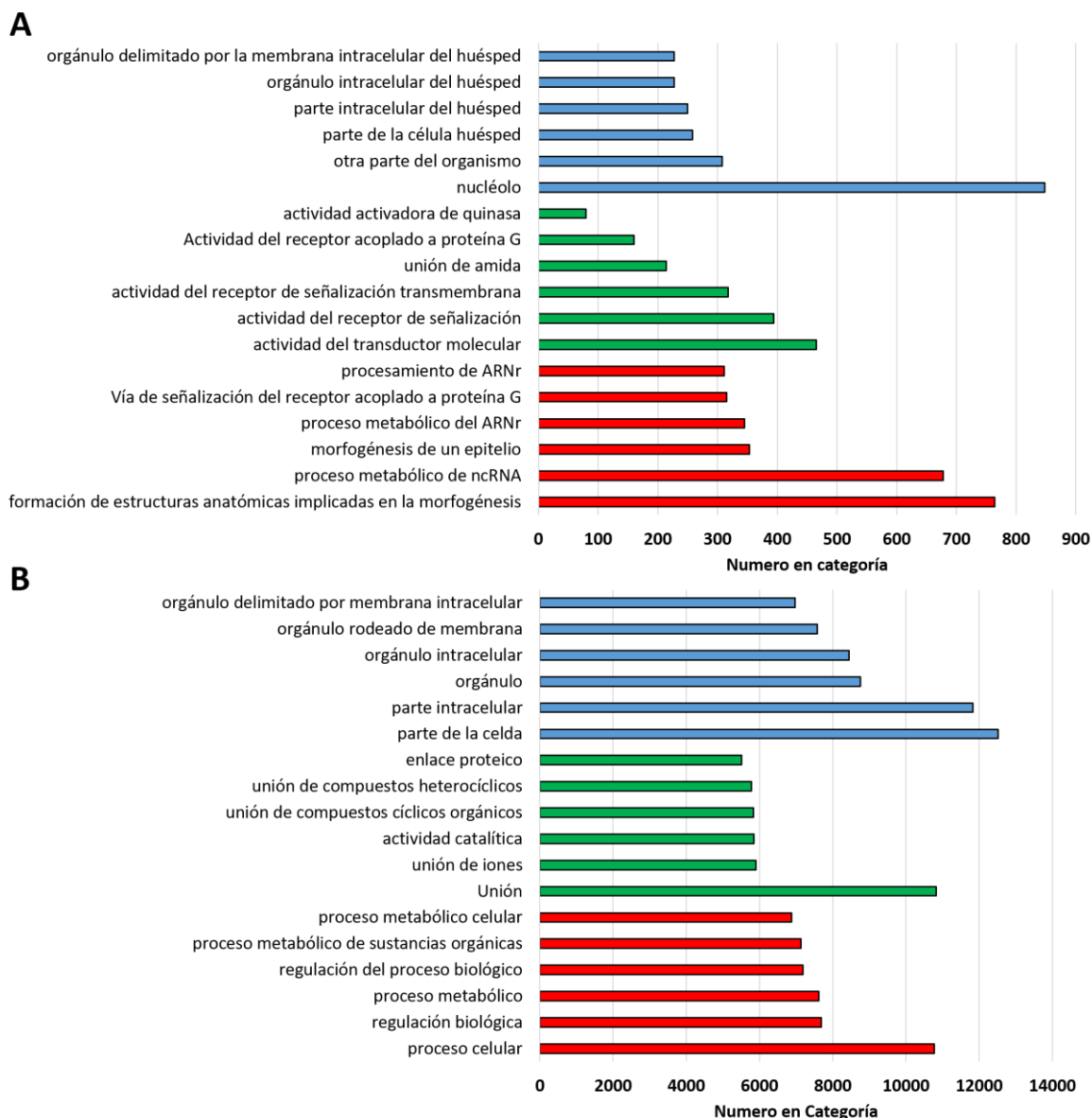
En la biblioteca de hemocitos inyección se encontraron términos enriquecidos que aumentaron en relación con procesos biológicos: proceso metabólico del compuesto organonitrógeno, proceso del desarrollo y proceso metabólico de proteínas. En función

molecular: actividad transferasa, unión al receptor de señalización, unión al factor de transcripción. En componente celulares: parte endosomal, membrana endosomal y centrosoma (Fig. 17A). En los genes que disminuyeron su expresión se encontraron términos de procesos biológicos: proceso celular, proceso metabólico y proceso metabólico de sustancias orgánicas. En función molecular: unión, actividad catalítica y unión a iones. En componente celular: parte de la célula, parte intracelular y parte citoplásmica (Fig. 17b).

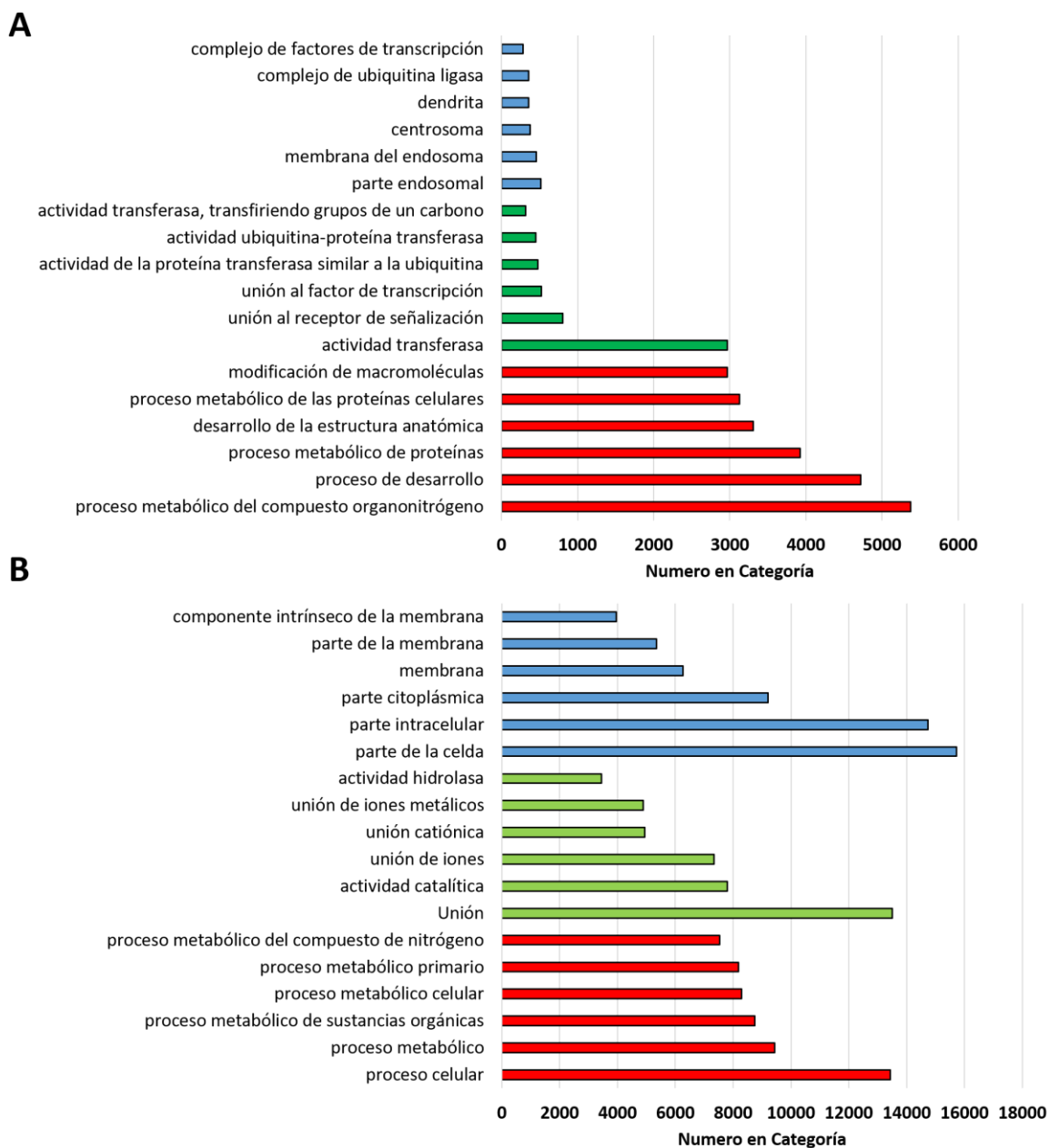


**Figura 15.** Análisis de enriquecimiento de los términos GO, biblioteca hepatopancreas inmersión de *Litopenaeus vannamei*. La figura muestra el número de términos de la GO, las barras rojas representan los procesos biológicos, las verdes las funciones moleculares y las azules los componentes celulares. A) Términos de los transcritos diferencialmente expresados enriquecidos. B) Términos de los transcritos diferencialmente expresados agotados. La prueba hipergeométrica se realizó con un valor de  $P < 0.001$ .



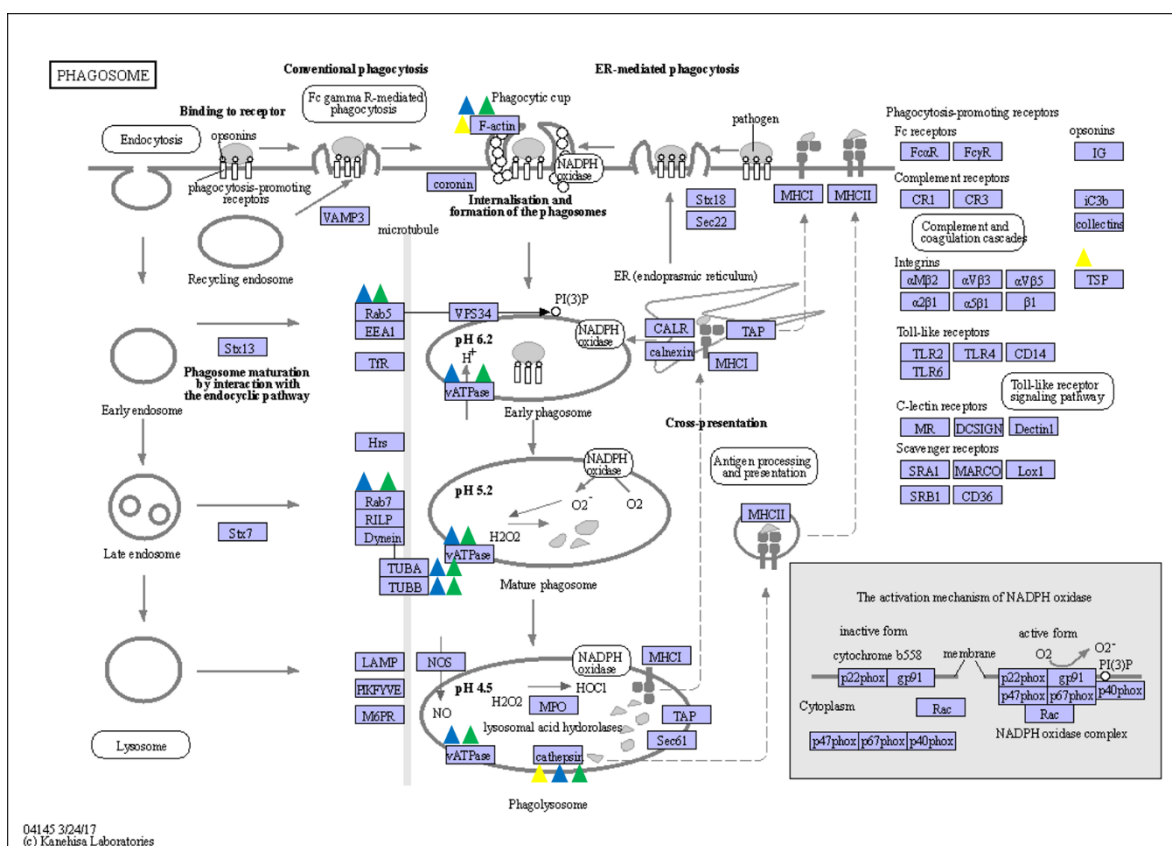


**Figura 16.** Análisis de enriquecimiento de los términos GO, biblioteca hemocitos inmersión de *Litopenaeus vannamei*. La figura muestra el número de términos de la GO, las barras rojas representan los procesos biológicos, las verdes las funciones moleculares y las azules los componentes celulares. A) Términos de los transcritos diferencialmente expresados enriquecidos. B) Términos de los transcritos diferencialmente expresados agotados. La prueba hipergeométrica se realizó con un valor de  $P < 0.001$ .



**Figura 17.** Análisis de enriquecimiento de los términos GO, biblioteca hemocitos inyección de *Litopenaeus vannamei*. La figura muestra el número de términos de la GO, las barras rojas representan los procesos biológicos, las verdes las funciones moleculares y las azules los componentes celulares. A) Términos de los transcritos diferencialmente expresados enriquecidos. B) Términos de los transcritos diferencialmente expresados agotados. La prueba hipergeométrica se realizó con un valor de  $P < 0.001$ .

Para el análisis de rutas metabólicas se encontró que la ruta del Fagosoma (Figura 18), correspondiente al proceso biológico de la fagocitosis. Se encuentran genes de las tres bibliotecas analizadas en la Tabla V se detalla el número de genes encontrados por biblioteca.

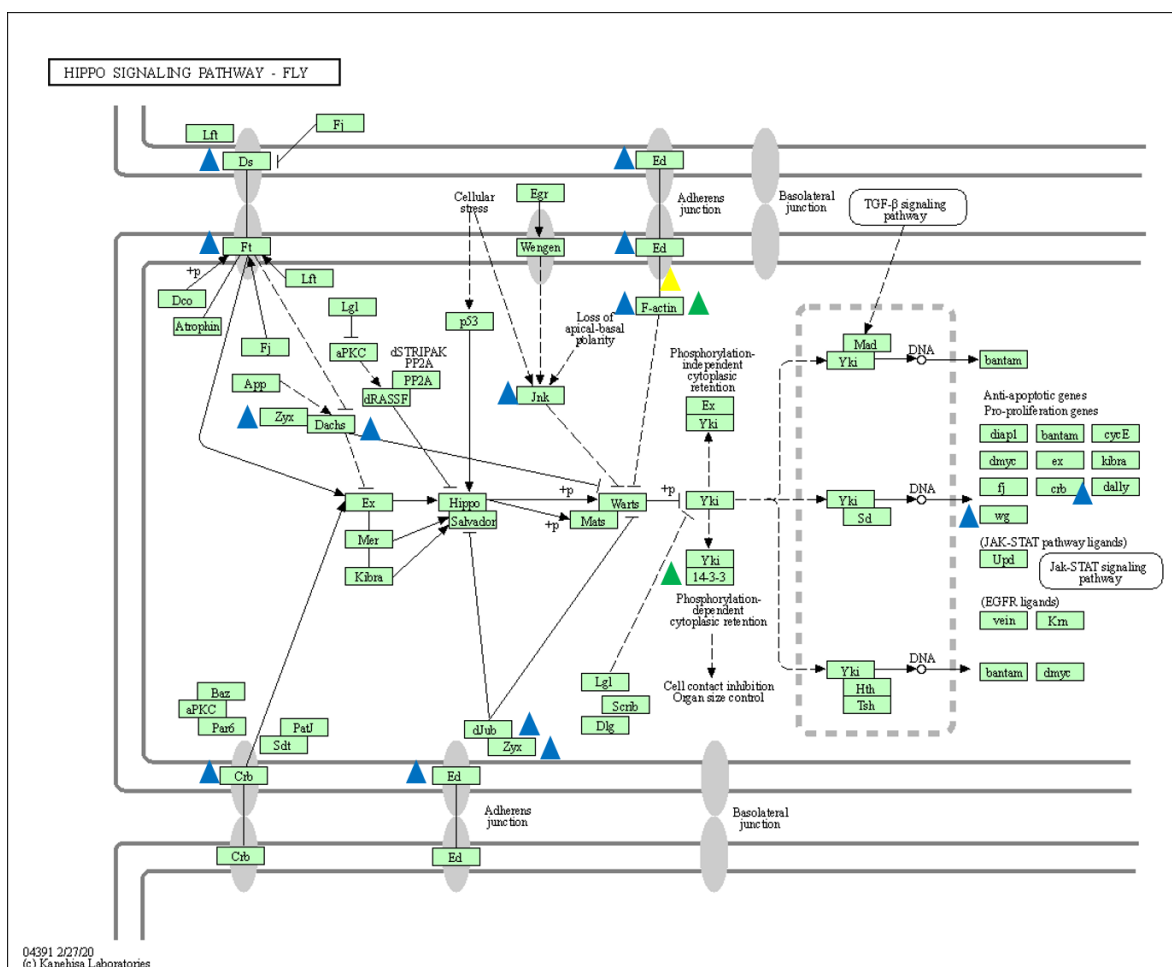


**Figura 18.** Ruta del Fagosoma (ko04145). Los genes que aumentaron su expresión de las 3 bibliotecas relacionados con la ruta del Fagosoma. Los triángulos amarillos representan la biblioteca de hepatopáncreas por inmersión, los verdes hemocitos por inmersión y azul hemocitos por inyección [40].

La otra ruta de interés que coincidió fue la de Salvador-Warts-Hippo que está relacionada con la proliferación y el control de la apoptosis (Tabla V).

**Tabla V.** Resumen de las rutas metabólicas de los genes que aumentaron su expresión en las tres bibliotecas. Hepatopáncreas inmersión (LvHep), hemocitos inmersión (LvHem) y Hemocitos inyección (LvChi).

<b>Biblioteca</b>	<b>Ruta metabólica</b>	<b>Número</b>	<b>Valor de P</b>
LvHep	Rutas metabólicas	18	8E-2
	Fagosoma	7	4.8E-4
	Fototransducción	6	1.7E-5
	Ruta Salvador-Warts-Hippo	6	1.1E-2
	Metabolismo de glutatión	4	5.3E-2
	Metabolismo de taurina e hipotaurina	3	3.8E-3
	Metabolismo de tirosina	3	2.0E-2
LvHem	Ribosoma	26	1.99E-03
	Fagosoma	22	6.10E-10
	Procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico	21	3.14E-05
	Spliciosoma	17	2.34E-03
	Endocitosis	16	3.43E-03
	Ruta Salvador-Warts-Hippo	9	1.92E-02
	Fototransducción	8	4.34E-04
	Biosíntesis de aminoácidos	8	7.58E-02
	Transportadores ABC	6	7.10E-05
	Interacción ECM-receptor	5	2.81E-03
	Metabolismo del ácido araquidónico	4	3.75E-02
Metabolismo del ácido linoleico	3	4.46E-02	
LvChi	Proteólisis mediada por ubiquitina	22	2.50E-06
	Procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico	24	1.45E-05
	Fototransducción - volar	10	2.83E-05
	Vía de señalización Wnt	18	1.14E-04
	Proteasoma	13	1.27E-04
	Ruta Salvador-Warts-Hippo	14	1.40E-04
	Endocitosis	21	1.62E-04
	Fagosoma	16	1.70E-04
	Metabolismo de las purinas	21	7.56E-04
	Transportadores ABC	5	2.32E-03
	Vía de señalización MAPK - volar	6	5.20E-03
	Vía de señalización FoxO	10	9.54E-03
	Spliciosoma	16	2.84E-02
Interacción ligando-receptor neuroactivo	6	9.74E-02	



**Figura 19.** Ruta Salvador-Warts-Hippo (dme04391). Los genes que aumentaron su expresión de las 3 bibliotecas relacionados con la ruta del Fagosoma. Los triángulos amarillos representan la biblioteca de hepatopancreas por inmersión, los verdes hemocitos por inmersión y azul hemocitos por inyección [40].

Las rutas metabólicas de los genes que disminuyeron su expresión se muestran en la Tabla VI, donde se puede observar el número de genes para cada biblioteca.

**Tabla VI.** Resumen de las rutas metabólicas de los genes que disminuyeron su expresión en las tres bibliotecas. Hepatopáncreas inmersión (LvHep), hemocitos inmersión (LvHem) y Hemocitos inyección (LvChi).

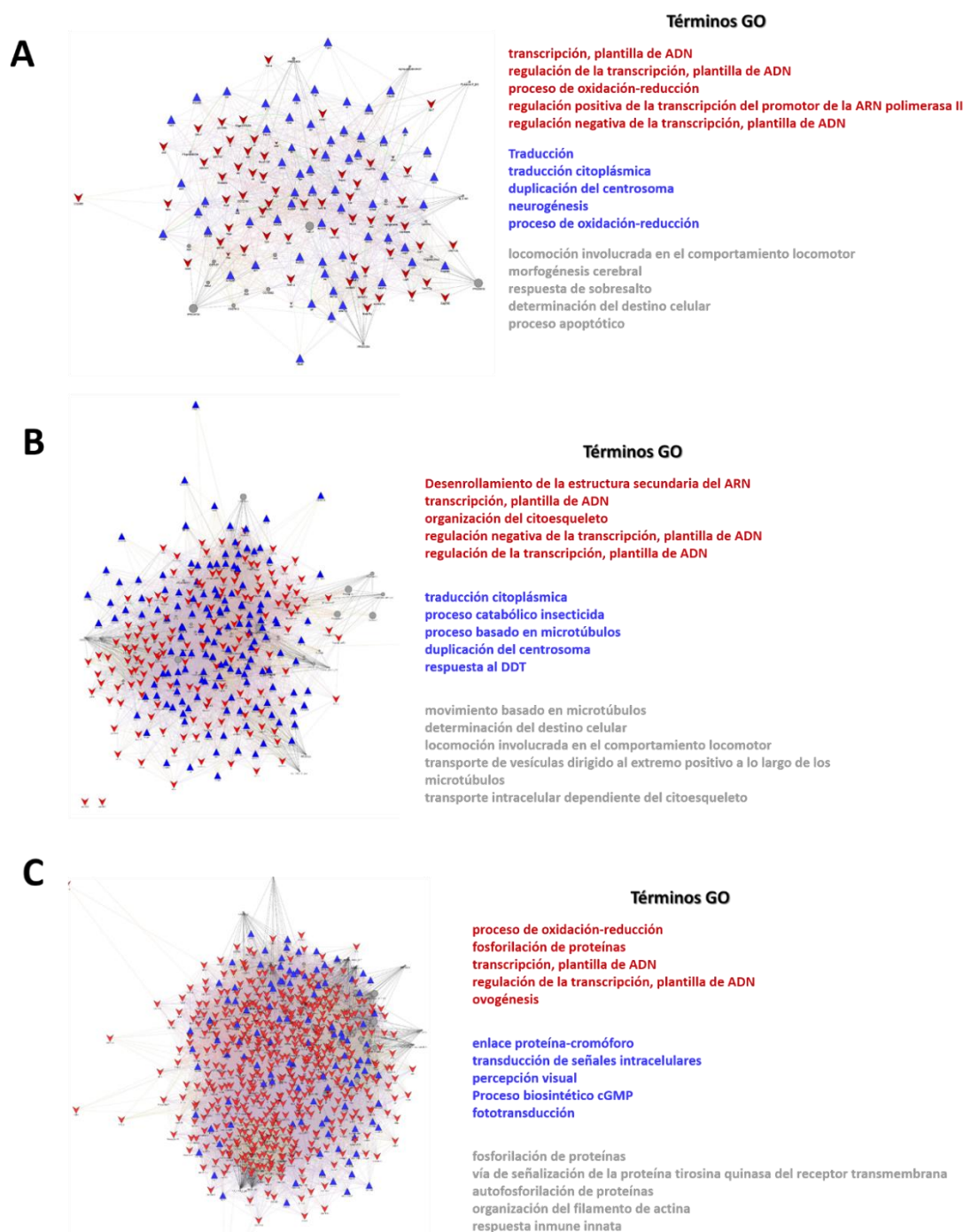
<b>Biblioteca</b>	<b>Ruta metabólica</b>	<b>Número</b>	<b>Valor de P</b>
LvHep	Vías metabólicas	31	3.03E-38
	Metabolismo de la porfirina y la clorofila	26	1.33E-37
	Interconversiones de pentosas y glucuronato	26	1.32E-34
	Metabolismo de fármacos: otras enzimas	26	3.11E-34
	Metabolismo de ascorbato y aldarato	25	7.25E-33
	Metabolismo del retinol	25	2.12E-27
	Metabolismo de fármacos - citocromo P450	25	2.12E-27
	Metabolismo de xenobióticos por citocromo P450	25	2.20E-11
	Interacción ligando-receptor neuroactivo	12	6.83E-04
LvHem	Vías metabólicas	61	3.66E-02
	Biosíntesis de antibióticos	29	1.89E-07
	Metabolismo del carbono	24	9.37E-09
	Metabolismo del nitrógeno	13	6.67E-12
	Degradación de ácidos grasos	13	1.75E-08
	Proteasoma	13	9.42E-06
	Biosíntesis de aminoácidos	13	1.11E-04
	Degradación de valina, leucina e isoleucina	12	3.05E-07
	Metabolismo de los ácidos grasos	10	3.29E-04
	Metabolismo de glioxilato y dicarboxilato	9	6.16E-05
	Glucólisis / Gluconeogénesis	8	2.38E-02
LvChi	Interconversiones de pentosas y glucuronato	34	2.74E-19
	Metabolismo del retinol	30	5.16E-22
	Proteasoma	30	4.15E-12
	Metabolismo de ascorbato y aldarato	28	1.78E-19
	Metabolismo de xenobióticos por citocromo P450	28	6.14E-08
	Metabolismo de fármacos - citocromo P450	28	6.14E-08
	Metabolismo de la porfirina y la clorofila	26	6.15E-11
	Metabolismo de fármacos: otras enzimas	26	1.67E-09
	Endocitosis	26	5.83E-02
	Vía de señalización Wnt	25	3.42E-03
Resistencia a la insulina	23	7.98E-07	
Interacción ligando-receptor neuroactivo	21	1.48E-08	

#### 7.4.4 Redes de interacción proteína-proteína

Los genes diferencialmente expresados (DEGs) fueron analizados en las tres bibliotecas (Fig. 20). Los genes que aumentaron y disminuyeron su expresión fueron analizados utilizando las redes de interacción proteína-proteína utilizando *Drosophila melanogaster* como especie fuente. En la *red 1*, se muestran los resultados de la biblioteca de hepatopáncreas. Respecto, a los genes que disminuyeron su expresión se encontraron los siguientes términos GO: procesos del metabolismo de ADN, transcripción de la ARN polimerasa II y procesos de óxido-reducción (Fig. 20A). Los términos GO en los genes que aumentaron su expresión fueron: la traducción de proteínas y procesos de óxido-reducción. El algoritmo de GeneMANIA, cuando realiza las interacciones, predice estas con los genes que se analiza la red, en este caso la predicción del algoritmo de GeneMANIA el término GO fue proceso apoptótico, para la *red 1*.

La *red 2* muestra, que los genes que disminuyeron su expresión tienen términos GO: transcripción y organización del citoesqueleto. En los genes que aumentaron su expresión se encontró el término GO, proceso catabólico de insecticidas. En el caso de los genes predichos por el algoritmo en esta red fue el movimiento de microtúbulos y determinación del destino celular (Fig. 20B).

La *red 3* muestra los resultados de la biblioteca de hemocitos por inyección de Zhang *et al.*, [40]. En los genes que disminuyeron su expresión, se encontraron términos GO: procesos de óxido-reducción y fosforilación de proteínas. En los genes que aumentaron su expresión los términos GO fueron: enlaces de proteínas cromóforo y transducción de señales celulares. En los genes predichos por el algoritmo se encontraron los siguientes términos GO: fosforilación de proteínas, y la vía de señalización de la proteína tirosina quinasa del receptor transmembranal.



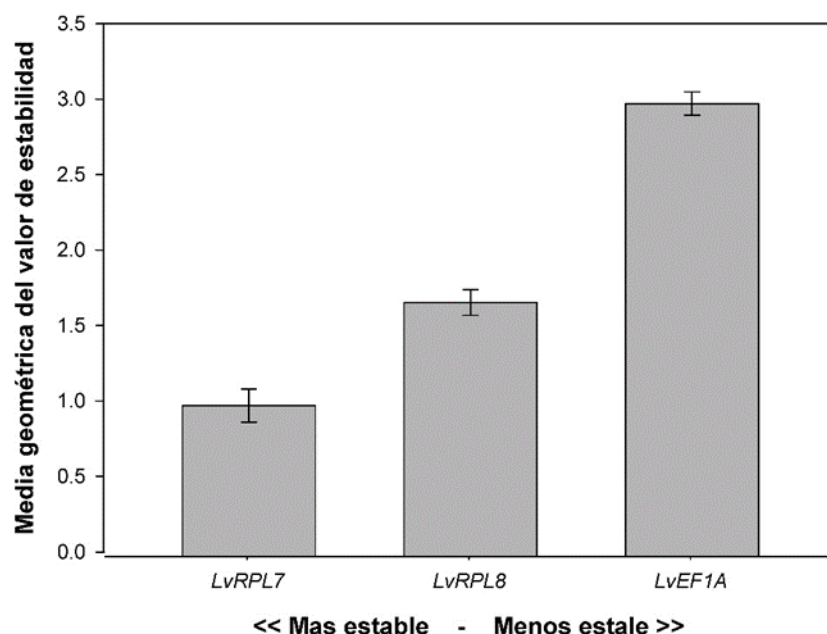
**Figura 20.** Redes de interacción proteína-proteína de bibliotecas genómicas de *Litopenaeus vannamei*. A) Biblioteca de hepatopáncreas por inmersión. B) Biblioteca de hemocitos inmersión. C) Biblioteca hemocitos inyección, datos de Zhang *et al.*, [40]. Los triángulos rojos representan los genes que disminuyeron su expresión, los azules representan los genes que aumentaron su expresión. Los círculos grises representan los predichos por *GeneMANIA*.



### 7.5 Análisis de expresión relativa (RT-qPCR)

La selección de genes se realizó con base en las funciones del metabolismo y del sistema inmunitario. En la Tabla II se describen los genes seleccionados para evaluar su expresión relativa por la técnica de RT-qPCR, estos resultados sirven para validar los datos obtenidos en los análisis de ARNm-seq, también en la tabla se describe la secuencia de los oligonucleótidos, parámetros de amplificación y la eficiencia determinada por el método de diluciones seriadas.

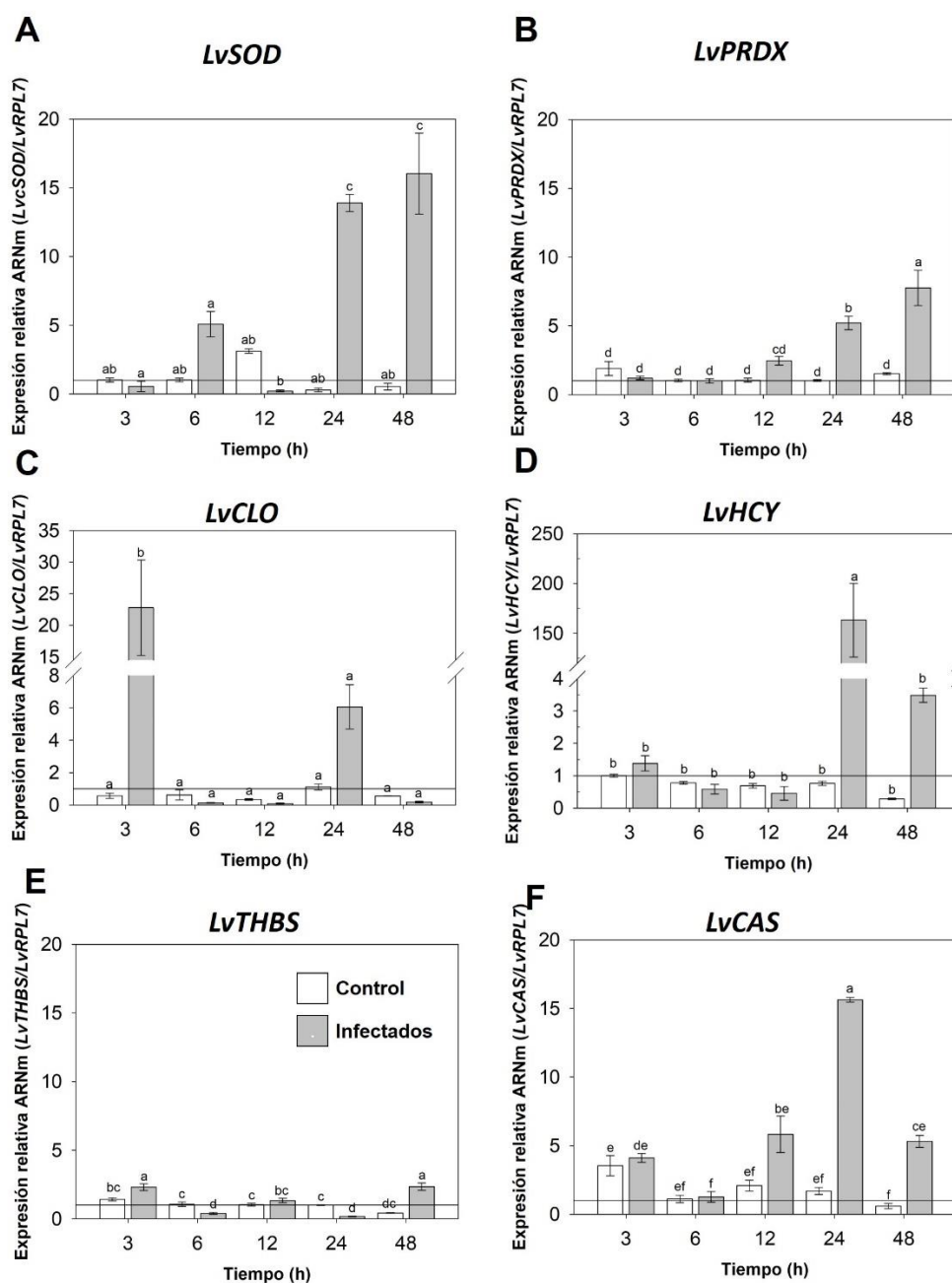
Para realizar una correcta determinación de la expresión relativa, se seleccionó cuidadosamente el gen de referencia, en este caso utilizamos 3 genes de referencia (*LvRPL7*, *LvRPL8* y *LvEF1A*); el gen de referencia seleccionado fue estable para todas las condiciones del experimento, por grupo y por tiempo. El gen de referencia más estable para estas condiciones fue el *LvRPL7*, el cual nos dio un parámetro  $M < 1.5$  (Fig. 21).



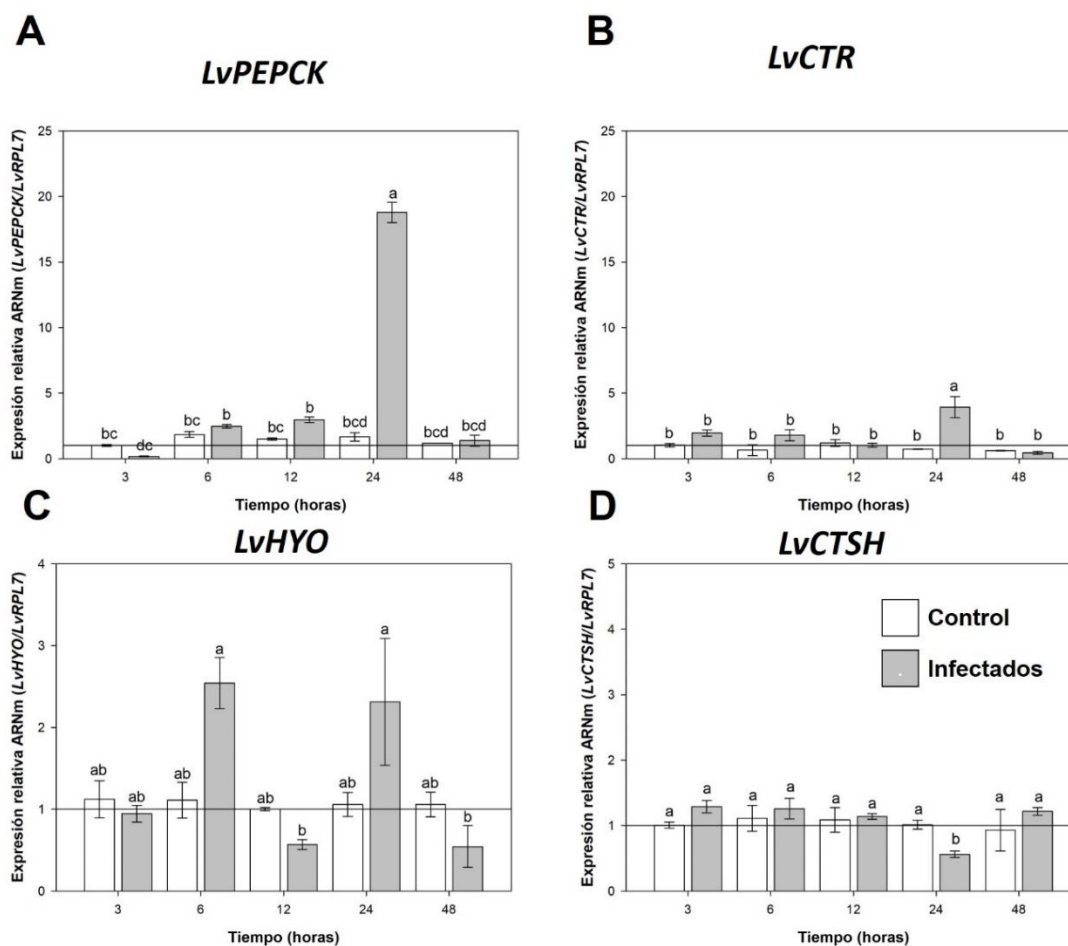
**Figura 21.** Estabilidad de los genes de referencia con el tratamiento de organismos de *Litopenaeus vannamei* infectados con *Vibrio parahaemolyticus* en el hepatopáncreas. Las barras indican la media geométrica obtenida de los 4 algoritmos (Delta CT, BestKeeper, GeNorm y Normfinder) las líneas de error indican error estándar ( $n = 4$ ).

La selección de los 10 genes fue con base en: los datos de enriquecimiento del GO y la tasa de cambio (*fold change*) obtenido en el análisis de expresión diferencial de ARNm-seq (7.4.2). La expresión relativa de los genes relacionados al sistema inmunitario de *L. vannamei* se muestran en la Figura 22. El gen de superóxido dismutasa (*LvSOD*), incrementó su expresión a las 6, 24, y 48 hpi en grupo infectado con *V. parahaemolyticus*, por otro lado, la expresión disminuyó significativamente a las 12 hpi (Fig. 22A). El gen de la peroxirredoxina (*LvPRDX*) mostró un incremento gradual de las 12 a las 48 hpi (Fig. 22B). La expresión relativa del gen de la proteína de coagulación (*LvCLO*) incrementó significativamente a las 3 y 24 hpi (Fig. 22C). El gen que codifica a la hemocianina (*LvHYC*) incrementó su expresión arriba de 150 veces a las 24 hpi y disminuyó a las 48 hpi (Fig. 22D). El gen que codifica a la trombospondina (*LvTHBS*) tuvo un leve incremento a las 3 y a las 48 hpi, por otro lado, se encontró una disminución a las 6 y 24 hpi (Fig. 22E). Por último, el gen de la susceptibilidad a apoptosis (*LvCAS*), incrementó a las 3, 12, 24 y 48 hpi comparado con los grupos controles alcanzando su máxima expresión a las 24 hpi (Fig. 22F).

La expresión relativa de los genes relacionados al metabolismo de *L. vannamei* se muestran en la Figura 23. El gen de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (*LvPEPCK*) incrementó su expresión a las 6 y a las 24 hpi, su expresión alcanzó 20 veces más que el grupo control (Fig 23A). La quimotripsina tuvo pequeños incrementos a las 3 y 24 hpi, aunque la diferencia significativa solo se observó las 24 hpi (Fig. 23B). El gen regulado positivamente por hipoxia (*LvHYO*) su expresión disminuyó a las 12 y 48 hpi (Fig. 23C). Finalmente, el gen de la catepsina (*LvCTSH*) cual codifica la catepsina L, mostró una disminución significativa a las 24 hpi y el resto de los tiempos no hubo diferencias significativas comparadas con los controles (Fig. 23D).



**Figura 22.** Expresión relativa de ARNm de genes relacionados al sistema inmune de *Litopenaeus vannamei* durante la infección con *Vibrio parahaemolyticus* en hepatopáncreas. Resultados de RT-qPCR mostrando la expresión relativa de los genes de interés. Para todas las gráficas el eje de las X muestra el tiempo post-infección (hpi), el eje de las Y muestra la expresión relativa (gen blanco/*LvRPL7*); las barras muestran la media y las líneas de error representan el error estándar ( $n = 9$ ). La línea continua representa los valores normalizados del tiempo cero y las letras muestran las diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). A) Superóxido dismutasa citosólica. B) Peroxirredoxina. C) Proteína de coagulación. D) Hemocianina. E) Trombospondina. F) Proteína de susceptibilidad a apoptosis.



**Figura 23.** Expresión relativa de ARNm de genes relacionados al metabolismo de *Litopenaeus vannamei* durante la infección con *Vibrio parahaemolyticus* en hepatopáncreas. Resultados de RT-qPCR mostrando la expresión relativa de los genes de interés. Para todas las gráficas el eje de las X muestra el tiempo post-infección (hpi), el eje de las Y muestra la expresión relativa (gen blanco/*LvRPL7*); las barras muestran la media y las líneas de error representan el error estándar ( $n = 9$ ). La línea continua representa los valores normalizados del tiempo cero y las letras muestran las diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). A) Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. B) Quimotripsina. C) Gen regulado positivamente por hipoxia. D) Catepsina L.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Reto con *Vibrio parahaemolyticus* IPNGS16

El proceso infeccioso de la cepa de *Vibrio parahaemolyticus* IPNGS16 posee una característica distintiva a otras cepas que afectan a peces y crustáceos. Estas cepas contienen un plásmido que le otorgan nuevas características de patogenicidad, principalmente por la producción de toxinas PirAB<sup>VP</sup>. Se observó la morfología microscópica de esta cepa y su coloración como bacteria gram negativa. Utilizando métodos moleculares se encontró que cepa *V. parahaemolyticus* IPNGS16, contiene los genes del plásmido que codifican a PirAB<sup>VP</sup> [6,16,87].

La determinación de la concentración adecuada para llevar a cabo la infección experimental fue necesaria para poder estandarizar utilizando la concentración letal media (CL<sub>50</sub>). La infección se realizó vía inmersión, colocando el patógeno en el agua, para esperar el proceso infeccioso en los animales, emulando las condiciones naturales. Las concentraciones celulares utilizadas en el cálculo de la CL<sub>50</sub>, están con base en lo reportado [88]. Los resultados mostrados en la CL<sub>50</sub> fueron proporcionales, es decir, a mayor cantidad de bacteria, mayor mortalidad acumulada en un menor tiempo. En investigaciones anteriores las infecciones se realizan vía intramuscular (por inyección), los resultados fueron que los organismos mueren con signos de la AHPND, pero no presentan el daño histopatológico de necrosis y el desprendimiento de celular en hepatopáncreas [6]. Esto indica que el mecanismo de patogénesis del *V. parahaemolyticus* IPNGS16 es a nivel de sistema digestivo, ya que esta es la primera barrera vulnerada por la bacteria, aquí es donde se produce el aumento de la carga bacteriana y la expresión de la toxina. La infección por inyección intramuscular muestra mortalidades asociadas al daño y desgarre del músculo [6,88,89].

## 8.2 Daño histopatológico en la AHPND

Los daños histopatológicos que se presentan en la AHPND son: necrosis, desprendimiento de células epiteliales del túbulo del hepatopancreas, atrofia e infiltración masiva de hemocitos. Las lesiones anteriormente mencionadas fueron detectadas en nuestro análisis histopatológico [14]. A las 0 hpi, observamos un corte histológico normal, mientras que a las 12 hpi se observa el desprendimiento de células epiteliales, de hecho otros autores reportan este signo como patognomónico en estómago en las primeras hpi [90]. En nuestros resultados semicuantitativos, observamos que a las 12 hpi existe un grado de >1 de lesiones asociados al desprendimiento de células epiteliales y alcanza su punto máximo >2.5 a las 24 hpi. Mediante simulación de modelamiento se ha observado que las toxinas son homologas estructurales a la toxina *Cry* de *Bacillus thuringiensis* el mecanismo es desconocido porque no se ha encontrado el receptor de las toxinas PirAB<sup>vp</sup>, se cree que forman poros y se interrumpe la unión célula-célula mediados por integrinas [91].

La necrosis es un tipo de muerte celular, que pueden ser reconocidos por histopatología por la pérdida de estructura del núcleo: pignosis y cariolisis. La pignosis cuando el núcleo se retrae por la condensación de cromatina, mientras la cariolisis es la disolución del núcleo. En nuestros resultados encontramos que la necrosis aumenta linealmente en relación con las hpi. Las toxinas *Cry* forman poros que causan “ablación celular”, por tanto, se hipotetiza que estas aperturas en la membrana inducen necrosis en las células epiteliales [91,92].

A partir de las 24 hpi observamos atrofia en las células que es la pérdida de sustancias celulares, en este caso las células B disminuyen sus vacuolas en consecuencia, estas pierden su tamaño. La atrofia se encuentra por encima de 50% en el hepatopancreas durante la AHPND, en nuestros datos vemos que la atrofia disminuye aunque no de manera significativa [93].

La infiltración de hemocitos es un mecanismo biológico natural que tiene como propósito reparar heridas, en la AHPND vemos que la el desprendimiento, la necrosis y la atrofia

aumentan, por lo tanto el hepatopancreas se infiltra de hemocitos [94]. Una vez que el tejido está dañado los hemocitos cumplen diversas funciones como: la coagulación, la melanización, encapsulación y fagocitosis. La AHPND presenta una mortalidad del 90-100% en los organismos se puede entender que el efecto de las toxinas causa un daño irreversible, además se reporta que los organismos dejan de comer y modifican su metabolismo para hacer frente a la infección y posteriormente al efecto de las toxinas [95].

### **8.3 Indicadores bioquímicos durante la AHPND**

La medición de glucosa, glucógeno, lactato, colesterol, triglicéridos, lípidos totales, proteínas totales y hemocianina sirve para monitorear la condición fisiológica del organismo, En *L. vannamei* la glucosa y el lactato están asociados al estrés. [96,97]. La concentración de glucosa solo disminuyó significativamente a las 3 hpi, en los demás tiempos disminuye con respecto al control, pero no de manera significativa. Los crustáceos tienen un buen control de la glucosa sérica y tienen varias estrategias fisiológicas para mantener los niveles de glucosa regulados en hemolinfa, tanto para incorporarla a los tejidos como para liberarla a la circulación, según la necesidad. El primero de ellos es el almacenamiento/utilización de glucógeno en hepatopáncreas, músculo y hemocitos, aunque en este último no se ha encontrado glucosa-6-fosfato (G6P), que representa el intermediario en este proceso. El segundo de ellos es utilizar la glucosa por glucólisis ya sea para síntesis de lípidos como para obtener energía por su oxidación completa. De manera inversa se puede sintetizar glucosa a partir de aminoácidos por la vía de gluconeogénesis. Finalmente, la glucosa puede incorporarse a vía de síntesis de compuestos estructurales como sería la formación de quitina, que es el componente estructural del exoesqueleto de crustáceos [98–100]. Durante las primeras hpi se sabe que la bacteria aumenta su carga bacteriana, por lo que se espera una respuesta inmunitaria en respuesta a esto; la demanda de glucosa aumente en tejidos lo cual podría explicar su disminución en hemolinfa de manera significativa. En contraste, otros estudios demuestran que la glucosa en hemolinfa incrementa en hpi, en infecciones con *Vibrio* por inyección [16,101]. Las diferencias encontradas en nuestros resultados comparados con otros estudios pueden ser producto de la vía de administración

del patógeno, resultando en efectos diferenciales en las vías de captación y producción de glucosa entre tejidos y hemolinfa. En este sentido la inmersión tendría un efecto inicial de demanda de glucosa, sobre todo a nivel de branquias y sistema digestivo, mientras que la inyección implicaría un efecto primario a nivel de músculo, pudiendo estimular la producción de glucosa en este tejido.

El lactato es un metabolito relacionado al estrés en *L. vannamei* porque se produce en la vía de glucólisis anaerobia en periodos de hipoxia. En nuestros resultados, si bien el lactato también disminuyó de manera significativa a las 3 hpi, se encontró un incremento a las 6 hpi, pudiendo indicar la utilización de la glucosa por vía anaerobia, que coincidiría con la demanda sugerida anteriormente y que es común en varias situaciones de anaerobiosis funcional [102]. En este sentido y con base en la patogénesis de la AHPND, a esta hpi existe un aumento de la carga bacteriana en el tracto estomacal, demostrando que *L. vannamei* puede alterar su función metabólica en la absorción de oxígeno y aumentar el metabolismo anaerobio para evitar el aumento de la carga bacteriana [103]. A las 24 hpi se puede observar una disminución de lactato significativa, a este tiempo se ha reportado que *V. parahaemolyticus* se encuentra en bajas concentraciones en diversos tejidos, por lo que tenemos un efecto propio de las toxinas, por lo tanto, es probable que el metabolismo en este tiempo sea aerobio con una recirculación del lactato producido inicialmente [104].

En hemolinfa, los parámetros de proteínas y lípidos totales no mostraron diferencias significativas durante los tiempos que se evaluaron (0, 3, 6, 12, 24, y 48 hpi). El colesterol, la glucosa y el lactato disminuyeron significativamente a las 3 hpi en hemolinfa, el colesterol probablemente se situó en las membranas para impedir la ablación celular, que causan las toxinas PirAB<sup>VP</sup> [105,106], o bien que refleja un cambio en las lipoproteínas plasmáticas como la proteína de unión a  $\beta$ -glucano (BGBP) que juega un papel importante en la respuesta inmune de crustáceos [107]. A las 48 hpi el nivel aumentó respecto a control, pero en los tiempos restantes (24 y 12 hpi) no se observan cambios, la diferencia es una disminución en el grupo control.



En el caso de la hemocianina en hemolinfa se encontró que esta disminuyó significativamente respecto al control a las 3, 6, 12 y 24 hpi. La función de la hemocianina en los artrópodos es amplia, pero principalmente sirve para el transporte de oxígeno, aunque también juega un papel en la inmunidad innata. La hemocianina tiene actividad antiviral, antimicrobiana, induce apoptosis de hemocitos, promueve la unión a carbohidratos de la pared celular de bacterias y la aglutinación de patógenos, contribuyendo así a la eliminación de éstos [108]. Se ha demostrado que la hemocianina aglutina a *Vibrio parahaemolyticus* AHPND y es capaz de neutralizar su toxina, lo cual explicaría su disminución en la hemolinfa, por un efecto de neutralización de la toxina en tracto digestivo y hepatopáncreas [109].

La concentración de carbohidratos totales disminuyó a las 6 y 24 hpi, mientras que a las 48 hpi incrementó. En estas mediciones se puede tratar de glucosa o glucógeno y los valores de carbohidratos totales coinciden a las 6, 24 y 48 hpi entre glucógeno y carbohidratos totales. En un estudio de *D. melanogaster* se demostró que la respuesta inflamatoria induce glucólisis aerobia para abastecer la demanda biosintética y la energía durante la infección bacteriana [110]. Para dar una explicación más detallada del metabolismo de carbohidratos, podemos suponer que estamos frente a un efecto *Warburg*, aunque se necesitan más elementos para demostrarlo, y este mismo efecto se ha observado en infección aguda con el WSSV en *L. vannamei* [111].

En hepatopáncreas se midieron 5 variables: glucógeno, proteínas totales, carbohidratos totales, lípidos totales y triglicéridos. El glucógeno es un polisacárido formado por glucosas ramificadas y por ende constituye su almacén a nivel tisular. Su disminución a las 3 h y 6 h coincide con la demanda de glucosa. Esta disminución se observó en músculo tejido en el cual se almacena este polisacárido en crustáceos [112]. En los tiempos restantes se observan cambios transitorios de glucógeno. En el grupo control se observan cambios importantes que pueden relacionarse al ayuno prologado de los organismos durante el experimento [113].

La concentración de proteínas totales en hepatopáncreas tuvo una disminución a las 48 hpi. Este resultado aunados a las micrografías y a la evaluación semicuantitativa de las lesiones, indican que para este tiempo existe un nivel de atrofia celular y estructural de los túbulos del hepatopáncreas, el fenómeno de la atrofia celular y la disminución de proteínas se observó en el hepatopáncreas de *Ctenopharyngodon idella* en dietas con alto contenido en cobre [114].

En el músculo, las proteínas totales aumentaron de manera significativa a partir de las 6 hpi de manera significativa. La explicación de este fenómeno puede estar relacionada con el recambio proteico, que consiste en la síntesis glucosa (gluconeogénesis) a partir de ciertos aminoácidos (Ala, Gly, Cys, Ser, Thr), mientras que otros aminoácidos se recambian hacia músculo para ser acumuladas como proteínas. Este fenómeno de sobrecompensación en la de recuperación de proteína muscular se ha observado en músculo esquelético durante ejercicios prolongados (demanda alta de energía) [115,116].

Los lípidos totales en hepatopáncreas disminuyeron a las 3 y 6 hpi, mientras que a las 12 hpi incrementan, estudios han demostrado la existencia del intercambio de lípidos acilgliceroles y ácidos grasos entre hepatopáncreas y hemolinfa, lo cual podría explicar estas variaciones temporales. En el caso de triglicéridos los resultados fueron similares a lípidos totales, dado que estos representan un 29% de su peso seco en lípidos contra 2.34% de glucógeno, ya que los lípidos tienen una función estructural y energética muy importante en hepatopáncreas. [117].

Los lípidos totales del músculo disminuyeron a las 6 y 24 hpi, indicando su oxidación para satisfacer la demanda energética de este tejido, evitando así el uso de glucosa que está siendo destinada de manera prioritaria para satisfacer la demanda de la respuesta inmune. En el músculo de *D. melanogaster* los lípidos son oxidados para fines energéticos [118,119].

#### 8.4 Análisis de expresión diferencial y relativa

En nuestros análisis de expresión diferencial de las tres bibliotecas: hepatopáncreas inmersión (*HepBibl1*), hemocitos inmersión (*HemBibl2*) y hemocitos inyección (*HemBibl3*), las primeras dos son datos generados para esta investigación y la última corresponde a un estudio de hemocitos en respuesta a la AHPND por el método de inyección [40]. En el análisis de expresión diferencial se obtuvieron para *HepBibl1* 536 y 218 transcritos que aumentaron y disminuyeron su expresión; para *HemBibl2* 1,021 y 13,725 y para *HemBibl3* 804 y 2,159. En las tres bibliotecas se encontraron diferencias en el número de genes que aumentaron y disminuyeron su expresión, estos cambios biológicos son causados por la inhibición o aumento de funciones celulares basales causadas por la infección y el efecto de las toxinas [120]. En nuestros resultados de las secciones anteriores observamos que probablemente existen dos etapas durante la AHPND, la primera etapa (0 a las 12/24 hpi) se observa primeramente una fuerte respuesta inmune y la segunda etapa está relacionada con el efecto de las toxinas y el deterioro de la estructura del hepatopáncreas [16,104].

Los genes que aumentaron su expresión en hepatopáncreas fueron: proPO, proteínas de almacenamiento de aminoácidos, lectinas, proteínas reparadoras del ADN, transporte de glucosa, inhibidores de serin-proteasa, proteínas de choque térmico entre otras. Los términos de procesos biológicos del GO: desarrollo de la cutícula, importación de glucosa, procesos catabólicos de péptidos, organización del citoesqueleto, respuesta al calor, respuesta a estrés y melanización. La respuesta transcripcional a las 24 h tiene relación con la melanización, ya que la melanina es un pigmento con actividad antibacteriana, la reparación de heridas e inmovilización de patógenos, activada por el sistema de la proPO y la cascada de serín-proteasa [121,122]. Las proteínas de choque térmico (*Hs70*) aumentaron su expresión en hepatopáncreas, estas proteínas participan como chaperonas durante estrés térmico y combaten la infección bacteriana causada por *V. parahaemolyticus* mediando el sistema inmune del camarón [123]. Los genes que disminuyeron su expresión en hepatopáncreas fueron: miosina, quitinasa, glucoroniltransferasa, resilina, receptor Toll, conectina. Los términos GO de procesos biológicos relacionados son: proteólisis,

biosíntesis de flavonoides, procesos metabólicos, procesos metabólicos de quitina y respuesta a estrés oxidativo. Otro grupo de genes que disminuyó su expresión se relaciona con las proteínas estructurales del tejido, la ausencia de estos genes se asocia a que la necrosis puede ser un proceso regulado y controlado por las células, contrario a lo que se considera como desordenado [124,125].

En la biblioteca de hemocitos por inmersión los términos GO de procesos biológicos en los genes que aumentaron su expresión fueron: transducción de señales de proteínas *Rab*, desarrollo de cutícula, transporte mediado por vesículas, proceso catabólico de insecticidas, respuesta a DDT y plegamiento de proteínas. El término de interés es la respuesta al DDT con el concomitante proceso catabólico de insecticidas, lo cual tiene sentido, al considerar que las toxinas PirAB<sup>VP</sup> son insecticidas, con el mecanismo de acción propuesto en la apertura prolongada de los canales de sodio en la membrana celular [4,126]. El transporte mediado por vesículas fue un proceso a la alza en los hemocitos, interpretándolo como procesos de fagocitosis, como una de las principales respuestas ante la AHPND en *P. monodon* [127,128]. En cambio, en la biblioteca de hemocitos por inyección se encontraron términos GO a la alza de: proteínas, proteólisis y desarrollo de la cutícula basado en quitina y transporte transmembranal, así como aumento de expresión de los genes relacionados con la anti-apoptosis y el crecimiento celular [38]. Si bien, las infecciones por inyección han mostrado mortalidad, no se han analizado las características histopatológicas asociadas a la AHPND en el hepatopáncreas, por lo cual no podemos asociar las diferencias encontradas entre nuestros resultados y los de hemocitos por inyección con el daño tisular, este hecho puede ayudar a entender que la respuesta fisiológica e inmunológica es distinta entre inyección e inmersión de *V. parahaemolyticus* [38].

La prueba de enriquecimiento de la ontología de genes (GO) mostró en las funciones que aumentaron su expresión entre la biblioteca de hemocitos por inmersión y hepatopancreas en 3 categorías actividad de receptor de señalización y actividad transmembranal del receptor, mientras que en hemocitos inyección e inmersión la gran parte los procesos biológicos coincidieron en dendritas que son las prolongaciones del sistema nervioso, a pesar que en camarón no se han encontrado estos tipos celulares el conjunto de procesos

biológicos y funciones moleculares están asociados a este componente celular, dado lo anterior se debe investigar más sobre el papel del sistema nervioso de camarón durante este tipo de infecciones, ya que en otros modelos se ha observado que las células dendríticas funcionan como sensores de infección [129]. Por otro lado, entre las dos bibliotecas de inmersión se observó que la transducción de señales y los receptores de membrana fueron procesos biológicos en común, en *P. monodon* se observó que estos procesos estuvieron al alza durante la infección de *V. parahaemolyticus* AHPND en estómago [42]. Mientras que en hepatopáncreas los componentes celulares se concentraron en la parte extracelular y en la membrana plasmática, en hemocitos inmersión se observa que los componentes celulares se encuentran en las células huésped, esto quiere decir que la mayor parte de los procesos biológicos encontrados fueron en morfogénesis del epitelio, y la regulación del desarrollo celular. En estudios con *D. melanogaster* se ha observado que la secreción de colágeno tipo IV por los hemocitos activan la morfogénesis celular, justamente este proceso debe ser averiguado en extenso ya que solo tenemos evidencia del conjunto de genes que activan la morfogénesis pero no la evidencia biológica, ya que este puede ser un modelo de reparación de heridas causado por la toxinas PirAB<sup>VP</sup> en hepatopancreas durante la AHPND [130].

En las dos bibliotecas de hemocitos se encontraron 15 términos GO enriquecidos en común que disminuyeron: la unión a sustancias orgánicas, procesos metabólicos, actividad catalítica, actividad hidrolasa entre otros. La respuesta de insecticidas y su modelo de toxicidad indican que participan proteínas asociadas al estrés oxidativo, la estructura celular y del citoesqueleto, la digestión de proteínas y el metabolismo energético [131]. En el caso de la biblioteca de hepatopáncreas se encontró un término GO a la alza relacionado a metales de transición (hierro, cobalto, cobre y molibdeno) estos pueden ser secuestrados por las células, por un grupo de proteínas para limitar a los patógenos durante infecciones. En el modelo mamífero se ha observado que el epitelio inflamado induce la absorción de metales de transición [132].

En las bibliotecas de hepatopáncreas y hemocitos se encontró que la transducción de señales y los receptores de membrana fueron términos GO enriquecidos a la alza, estos resultados se contrastan en *P. monodon* donde se encontró información similar durante la infección de *V. parahaemolyticus* AHPND en estómago [42]. La ontología GO de componente celular en hepatopáncreas muestra que la mayor parte de procesos se lleva a cabo en *la parte extracelular y en la membrana plasmática*; en el caso de hemocitos la ontología de componente celular se realiza en *las células huésped*, esto quiere decir que la mayor parte de los términos de procesos biológicos fueron: morfogénesis del epitelio y la regulación del desarrollo celular. En estudios con *D. melanogaster* se ha observado que la secreción de colágeno tipo IV por los hemocitos, puede activar la morfogénesis celular, justamente este proceso debe ser analizado con mayor profundidad dado que solo tenemos evidencia del conjunto de genes que activan la morfogénesis pero no la evidencia biológica, pudiendo ser éste un modelo de reparación de heridas causado por la toxinas PirAB<sup>VP</sup> en hepatopáncreas durante la AHPND [130].

La ruta de *Salvador Warts Hippo* (SWH), se relaciona con el fagosoma y el endosoma, rutas encontradas en las 3 bibliotecas. La fagocitosis es una respuesta elemental del sistema inmune ante la invasión de agentes extraños y la endocitosis está ligada a esta ruta metabólica [133]. Es probable que a las 24 hpi ya no exista carga bacteriana, por lo que se puede predecir que la fagocitosis está enfocada en células necrosadas o apoptóticas [134]. La ruta SWH no ha sido definida en crustáceos pero si se han descrito algunos genes clave de la ruta [135,136]. En *D. melanogaster*, se ha observado que la ruta controla el tamaño de los tejidos por la modulación del crecimiento, la proliferación y la apoptosis, por lo que se le considera una ruta red del control de la supresión tumoral [137]. El análisis de la ruta de SWH en *L. vannamei* durante la AHPND, puede dar explicaciones más sólidas sobre la necrosis en las células epiteliales, ya que en *D. melanogaster* se observó que la proliferación celular en tejido atrofiado es activado por la ruta SWH [138]. La ruta de metabolismo de retinol se encuentra a la baja en la biblioteca de hemocitos por inyección y hepatopáncreas. En *D. melanogaster*, se concluyó que los retinoides sirven como punto de

revisión para la regeneración de tejido, por lo que se pregunta si durante la AHPND existe un mecanismo que bloquee esta ruta [139].

Las redes de interacción de proteína-proteína de hepatopáncreas se encontraron interacciones fundamentales en ambos grupos de genes diferencialmente expresados como el proceso de traducción de proteínas, la morfogénesis y procesos oxidativos. La regulación de la transcripción del ARN polimerasa II se encuentran en el set de genes que disminuyeron su expresión. Este fenómeno se relaciona en que no existe una correlación lineal entre la cantidad de transcritos y la cantidad proteína, además estos resultados provienen de transcriptomas ensamblados, por lo que la información encontrada debe corroborarse con experimentos complementarios. [140]. En la red donde se encuentra los dos sets de genes se encontró: óxido-reducción, específicamente los genes de la peroxidasa, dual-oxidasa, NADPH oxidasa.

La red de interacción de hemocitos por inmersión muestra los procesos que aumentaron la respuesta al DDT y al catabolismo de insecticidas, en concordancia con lo discutido anteriormente, la respuesta de las toxinas PirAB<sup>VP</sup> son similares a la respuesta al DDT en relación con la apertura de canales de Na<sup>+</sup> y la formación de poros. La principal respuesta transcripcional está orientada a genes relacionados con proteínas cuticulares, transportadores y enzimas envueltas en la cadena de transporte de electrones combinado con procesos de detoxificación [141]. Por otro lado, en esta biblioteca se observó que los procesos que disminuyeron su expresión están relacionados con la transcripción y el modelo de expresión de genes en ARNm mediante la estructura de la ARN polimerasa II. En estudios en los modelos de exposición al DDT, algunos factores de transcripción aumentan su expresión mientras que otros disminuyen, debido que la respuesta estará dirigida a la degradación del xenobiótico, a expensas de la disminución de ciertas funciones no vitales [142,143]. En el caso de las toxinas *Cry* de *Bacillus thuringiensis* se ha observado que la exposición de dosis muy bajas al mosquito *Aedes aegypti* este tiene una respuesta basal en endocitosis mediada por clatrina y el papel de la actina es clave en la detoxificación de la toxina *Cry* [144]. Aunque en el caso de la toxina PirAB<sup>VP</sup>, no se conoce del todo cual es la

respuesta a la detoxificación ya que es una toxina proteica, es muy probable que exista una respuesta de detoxificación similar a la de las toxinas *Cry* en *L. vannamei*.

El sistema inmune innato de *L. vannamei* contiene componentes celulares y humorales que trabajan individual y sinérgicamente para proteger la integridad del organismo durante infecciones y la invasión de agentes extraños, la activación de la respuesta depende de diversos mecanismos, que incluye la reparación de heridas, la coagulación, y la respuesta del sistema antioxidante [18]. Todos los organismos vivos producen especies reactivas de oxígeno durante la respiración aerobia. Las condiciones ambientales como el pH, la temperatura, hipoxia e infecciones pueden limitar la disponibilidad de oxígeno ( $O_2$ ) e incrementar las especies reactivas de oxígeno (ROS), resultando en estrés oxidativo para las células [145]. El incremento de las ROS puede causar daño a las membranas, enzimas y la integridad de los ácidos nucleicos. Los mecanismos endógenos de defensa estabilizan los niveles de las ROS y esto incluye enzimas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, peroxirredoxina, entre otras) [146]. Se encontraron términos GO enriquecidos ( $p < 0.01$ ) en procesos de óxido-reducción en la ontología de procesos biológicos y funciones moleculares.

En este trabajo identificamos dos genes relacionados al estrés oxidativo, la *LvPRDX* y la *LvSOD*. La *LvPRDX* pertenece a un grupo de encimas antioxidantes que protegen a la célula de las ROS por la reducción de un amplio rango de peroxidases. Observamos un incremento después de las 12 hpi, estos resultados concuerdan con una infección en *Exopalaemon carinicauda* contra *Vibrio anguillarum* [147]. Los niveles de ARNm de *LvSOD* incrementan en infecciones de *V. parahaemolyticus* y WSSV, lo que indica que tiene un rol esencial en la defensa en contra de estos patógenos [148]. En *Rattus norvegicus domestica* se observó que el aumento de enzimas antioxidantes tales como la superóxido dismutasa aumentaba degradación de compuestos asociados al DDT, aunque se desconocen los mecanismos de detoxificación de toxinas PirAB<sup>VP</sup>, este podría ser una de las rutas a estudiar para entender más profundamente los mecanismos de defensa [149].



La hemocianina (*LvHCY*) es una proteína abundante en la hemolinfa de los artrópodos y moluscos [150]. Su función principal es el transporte de oxígeno molecular, y un conjunto de funciones tal como el almacenamiento proteico, osmorregulación, ciclo de muda, formación del exoesqueleto y actividad antimicrobiana [108,151]. En nuestros datos de ARNm-seq encontramos que varias isoformas y subunidades de la *LvHCY* están presentes en los dos conjuntos de datos que aumentan y disminuyen su expresión. La expresión relativa de *LvHCY* mostró un aumento significativo a las 24 hpi. Estudios previos demuestran que la hemocianina tiene un efecto neutralizante de la toxina de PirAB<sup>VP</sup>, además de actividad antimicrobiana contra *V. parahaemolyticus* [109].

La coagulación es un proceso inmune para inmovilizar patógenos y detener la pérdida de hemolinfa por heridas [152]. En nuestros resultados obtuvimos que el gen de la proteína de coagulación (*LvCLO*) incrementó significativamente a las 3 hpi, las cascadas de coagulación son activadas cuando la carga bacteriana aumenta en el hospedero y activan a su vez el sistema proPO [153]. Estudios a nivel transcriptómico muestran en *P. monodon* un aumento de la expresión de genes de coagulación durante infecciones con *V. parahaemolyticus* [42]. Estos hallazgos muestran que la activación de la coagulación es un paso fundamental para combatir infecciones bacterianas en camarón.

Las trombospondinas son una familia de glicoproteínas que se unen a calcio, su función en vertebrados es mantener la matriz extracelular, la angiogénesis, sinaptogénesis y la organización del tejido conectivo [154]. Existe muy poca información sobre la trombospondinas en invertebrados, en el caso de camarones peneidos se ha sugerido que son parte de la respuesta de defensa ante infección microbiana en *Fenneropenaeus chinensis* retado con *V. anguillarum* y *Staphylococcus aureus* [155]. Además, en *P. monodon* se ha observado su función inmune en el órgano linfoide contra *V. harveyi* y el WSSV [156]. Nuestros resultados sugieren que la trombospondina juega un papel muy importante en un mecanismo de defensa durante la AHPND, ya que en el análisis de interacción de redes representa un gen eje, lo cual es reafirmado por nuestros resultados de expresión relativa, confirmando estudios previos [42].

La proteína de susceptibilidad a apoptosis tiene un papel como mediador de la apoptosis por el factor de necrosis tumoral asociado al factor de transporte nuclear (TNF) y es frecuentemente encontrada durante infecciones bacterianas, mientras que en células sanas, esta proteína actúa como interruptor de proliferación o apoptosis [157]. Esta proteína también se ha asociado a procesos de invasión de metástasis en células cancerosas [158]. En crustáceos, la proteína de susceptibilidad apoptosis está asociada al desarrollo del ovario y su función principal es nuclear, aunque en los hemocitos de *Eriocheir sinensis* después de un reto con *Spiroplasma eriocheiris* aumentó su expresión [159,160]. En nuestros datos de ARNm-seq y de RT-qPCR se observó que la expresión del gen de la proteína de susceptibilidad apoptosis (*LvCAS*) aumentó su expresión, lo que sugiere que es parte de un mecanismo esencial en la respuesta de la AHPND, en otro estudio en hemocitos se encontró un set de genes anti-apoptosis en respuesta a la AHPND [40].

El hepatopáncreas puede considerarse como análogo del páncreas e hígado en vertebrados y por ende, puede integrar funciones digestivas, inmunes y metabólicas, por lo que es un modelo interesante para estudiar inmunometabolismo [30]. Una de las principales enzimas de la gluconeogénesis es la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK). En condiciones de hipoxia existe un mecanismo molecular en hígado que activa la gluconeogénesis mediado por factores de transcripción que aumentan la expresión de enzimas gluconeogénicas como la PEPCK [161]. En las infecciones con *Vibrio* puede disminuirse el consumo de oxígeno e inducir hipoxia [162]. Se encontraron términos GO enriquecidos de procesos metabólicos y en especial encontramos el gen que codifica a la PEPCK, mismo que aumentó su expresión relativa 17 veces a las 24 hpi. Estos resultados se relacionan con los resultados de concentración de glucosa y lactato en hemolinfa; en músculo y hepatopáncreas la concentración de glucógeno, que implica una condición de anaerobiosis (efecto Warburg), en que implica mayor demanda de glucosa y la insuficiencia del glucógeno hepatopancreático para mantener los niveles de glucosa durante la AHPND. Aunado a lo anterior, los organismos se encontraban en ayuno en las condiciones experimentales del estudio, mientras que en condiciones naturales son incapaces de

alimentarse, por lo cual el proceso de gluconeogénesis cobra fundamental importancia [163,164].

La presencia de un anaerobiosis o efecto Warburg anteriormente descrito e indicativo de cierta hipoxia funcional, puede estar acompañado de cierto grado de hipoxia ambiental, en la cual no es la falta de oxígeno ambiental, sino de una captación branquial deficiente por el posible daño causado en este tejido por AHPND, particularmente en la infección por inmersión como fue el caso del presente trabajo. En este sentido las células se protegen utilizando un grupo de proteínas chaperonas, llamadas proteínas reguladas por oxígeno o HIF (hipoxia inducible factor, por sus siglas de sus siglas en inglés) [165]. El gen que codifica para HIF (*LvHYO*) aumentó su expresión relativa a las 6 y 24 hpi, lo cual coincide con trabajos previos, en donde el aumento de la expresión de genes anti-hipoxia durante la patogénesis bacteriana se relaciona al aumento de la carga bacteriana durante las etapas tempranas de la AHPND causando septicemia hepatopancreática debido a la carga bacteriana y al efecto nocivo de las toxinas PirAB<sup>VP</sup> [16,104].

La quimotripsina es una enzima de la clase serin-proteasa, que participa en reacciones inmunes y otras funciones fisiológicas [166]. La síntesis de quimotripsina se localiza en los túbulos del hepatopáncreas, el gen que codifica la quimotripsina (*LvCTR*), incrementó su expresión en *F. chinensis* ante la infección de *V. anguillarum* [167]. En nuestros datos de ARNm-seq observamos que el transcrito aumentó su expresión al igual que en los experimentos de RT-qPCR que revelan el incremento a las 24 hpi, si bien podemos determinar que la expresión aumentó, y se requieren experimentos más detallados para determinar la función exacta de *LvCTR* durante la AHPND. En el gusano *Choristoneura fumiferana* mostró que quimotripsina y mutaciones de esta aumentaban la toxicidad y la estabilidad de la toxinas *Cry* de *B. thuringiensis* en jugos gástricos, aunque se desconoce si existe alguna modificación de las toxinas PirAB<sup>VP</sup> por el efecto de la quimotripsina [168].

Las catepsinas son proteasas que mantienen el recambio celular, por medio de la digestión y depuración del alimento [169]. La catepsina L se asocia a la diferenciación de las células

F- y B- del hepatopáncreas [170]. En nuestros datos el gen que codifica a la catepsina L (*LvCTSH*) únicamente disminuyó su expresión a las 24 hpi de manera significativa. La importancia de *LvCTSH* durante la AHPND, se relaciona probablemente con su papel en la diferenciación celular y mantenimiento de las células del túbulo.

Existen diversos estudios en donde se analiza la respuesta patógeno-huésped en varias especies de camarones peneidos, pero no se ha abordado el tema de patógeno-toxina-huésped [16,40–42,156]. La respuesta inmunológica a nivel de transcriptómica fue analizada en *E. carinicauda* en la AHPND causada por *V. parahaemolyticus*, en este estudio se reveló que el gen regulado por hipoxia (*HYC*) y la quimotripsina (*CTR*) aumentaron su expresión, mientras que la catepsina L (*CTSH*) disminuyó su expresión [41]. Estos datos concuerdan con nuestros resultados y tienen la misma dinámica de expresión. Encontramos términos GO enriquecidos en las bibliotecas por inmersión: péptidos antimicrobianos, lectinas, cascada de serín-proteasa, estrés oxidativo, proteínas de reconocimiento de patrones, proteínas de coagulación y proteínas de choque térmico. En otro estudio realizado en estómago de *P. monodon* durante la AHPND en una infección de *V. parahaemolyticus*, se encontraron varios genes que también aumentaron su expresión en nuestra biblioteca de hepatopáncreas inmersión [42].

En los estudios que se mencionaron anteriormente, también se identifican genes clave del metabolismo, ya que las infecciones bacterianas hacen que el huésped modifique su metabolismo a través de la alteración de la homeostasis [171]. En nuestro análisis identificamos un grupo de genes que se modifican durante la AHPND relacionados con el metabolismo, en lo que se incluyen genes antioxidantes (*SOD*, *PRDX*), hemocianina (*HCY*), proteína de susceptibilidad a apoptosis (*CAS*), el gen de la fosfoenol piruvato carboxiquinasa (*PEPCK*), quimotripsina (*CTR*), gen regulado por hipoxia (*HYO*). Algunos de estos genes no han sido reportados durante infecciones bacteriana, un estudio más extenso a nivel de actividad y cantidad de las proteínas podría darnos una explicación detallada de como estos genes interactúan, junto con el sistema inmune para responder contra la infección y la afectación de las toxinas PirAB<sup>VP</sup>

## 9. CONCLUSIONES

Durante esta investigación se planteó estudiar el efecto de la AHPND en *L. vannamei*. En la primera sección determinamos que la bacteria *V. parahaemolyticus* IPNGS16, es una cepa que contiene el plásmido pVPA-3 y contiene en este los genes que codifican a las toxinas PirAB<sup>VP</sup>. Posteriormente se evaluó la patogenicidad y se calculó la CL<sub>50</sub>. En la segunda parte se evaluaron los parámetros bioquímicos en 3 tejidos, y finalmente utilizando el ARNm se evaluó la expresión global de genes a las 24 hpi en hepatopáncreas y hemocitos. Finalmente, el análisis de expresión relativa nos sirvió para corroborar el análisis de expresión global y reafirmar la expresión relativa en los genes de interés, basados en nuestra selección.

En el análisis histológico por una parte demostró que había lesiones con el paso del tiempo, y se observó que estas lesiones progresaban significativamente, estos datos fueron importantes para demostrar los signos de la AHPND previamente reportado por otros grupos de investigación. Estos resultados fueron la primer evidencia para concluir esta tesis, porque a nivel tejido observamos cambios en la estructura del hepatopáncreas, túbulos y células epiteliales que lo conforman. El aporte de los resultados a esta tesis sirve para relacionar el progreso temprano de la AHPND con otros parámetros bioquímicos y de expresión de genes, ya que oriento la explicación para las variaciones encontradas.

El análisis de los parámetros bioquímicos, indica que existen dos eventos durante la AHPND, con un primer efecto de alta demanda de glucosa (efecto Warburg) en las primeras horas causado por la patogénesis de la bacteria, y por otro lado el efecto de las toxinas, que aún se desconoce la manera en cómo el organismo las neutraliza.

El análisis de expresión diferencial global fue el que nos reveló detalles específicos de los procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares que estuvieron enriquecidos, observando las respuestas del hepatopáncreas y la de hemocitos. El hepatopáncreas responde a nivel metabólico principalmente con la ruta de la

gluconeogénesis y metabolismo de proteína, a nivel inmune la producción de hemocianina, proteínas de coagulación, choque térmico, hipoxia, y genes antioxidantes. Por otro lado, la respuesta de hemocitos nos dirige a que existe una respuesta inmune enfocada principalmente al catabolismo de insecticidas y al modelo de respuesta al DDT.

Lo concluido indica que existe un cambio a nivel metabólico e inmune durante la AHPND, con procesos biológicos específicos para ambos tejidos y también nos abre un nuevo enfoque de como estudiar esta enfermedad, porque los estudios previos no enfatizado el efecto de como los hemocitos expresan un conjunto de genes que siguen el modelo de respuesta al catabolismo de DDT.

## 10. LITERATURA CITADA

1. CONAPESCA. Anuario Estadístico de Comisión Nacional de Pesca y Acuicultura. 2020 [Citado 8 Nov 2020]. disponible en: <https://acuasesor.conapesca.gob.mx/anuario.php>
2. (OIE) WO for animal H. Animal Health in the World - Overview. 2019 [citado 28 Dic 2020]. Available: <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2019/>
3. De Schryver P, Defoirdt T, Sorgeloos P. Early Mortality Syndrome Outbreaks: A Microbial Management Issue in Shrimp Farming? PLoS Pathog. 2014;10: e1003919. doi:10.1371/journal.ppat.1003919
4. Tran L, Nunan L, Redman RM, Mohny LL, Pantoja CR, Fitzsimmons K, et al. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. Dis Aquat Organ. 2013;105: 45–55. doi:10.3354/dao02621
5. Lightner D V., Redman RM, Pantoja CR, Noble BL, Nunan LM, Tran L, et al. Documentation of an Emerging Disease (Early Mortality Syndrome or Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease ) in SE Asia & Mexico. 2013.
6. Joshi J, Srisala J, Truong VH, Chen I-T, Nuangsaeng B, Suthienkul O, et al. Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). Aquaculture. 2014;428: 297–302. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.03.030
7. Zorriehzakra MJ, Banaederakhshan R. Early Mortality Syndrome (EMS) as new Emerging Threat in Shrimp Industry. Adv Anim Vet Sci. 2015;3: 64–72. doi:10.14737/journal.aavs/2015/3.2s.64.72
8. Prachumwat A, Taengchaiyaphum S, Mungkongwongsiri N, Aldama-Cano DJ, Flegel TW, Sritunyalucksana K. Update on early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease by April 2018. J World Aquac Soc. 2018; 1–13. doi:10.1111/jwas.12559

9. Fischer W, Krupp F, Schneider W, Sommer C, Carpenter KE, Niem VH. Guía FAO para la Identificación de Especies para los Fines de la Pesca: Pacífico centro-oriental Volumen I. Plantas e Invertebrados. 1er ed. Roma, Italia: FAO; 1995. Available: <http://www.fao.org/3/t0851s/t0851s00.htm>
10. Dore I, Frimodt C. An Illustrated Guide to Shrimp of the World. 1st ed. An Illustrated Guide to Shrimp of the World. New York (US): Van Nostrand Reinhold; 1991. doi:10.1007/978-1-4684-8273-7
11. FAO. Estadísticas de pesca y acuicultura 2018. Roma, Italia: Anuario FAO; 2020.
12. Flegel TW. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *J Invertebr Pathol.* 2012;110: 166–173. doi:10.1016/j.jip.2012.03.004
13. Han JE, Tang KFJ, Tran LH, Lightner D V. *Phototrabdus* insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Dis Aquat Organ.* 2015;113: 33–40. doi:10.3354/dao02830
14. Soto-Rodriguez SA, Gomez-Gil B, Lozano-Olvera R, Betancourt-Lozano M, Morales-Covarrubias MS. Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81: 1689–1699. doi:10.1128/AEM.03610-14
15. Lee C-T, Chen I-T, Yang Y-T, Ko T, Huang Y, Huang J, et al. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proc Natl Acad Sci.* 2015;112: E5445–E5445. doi:10.1073/pnas.1517100112
16. Lai H-C, Ng TH, Ando M, Lee C Te, Chen I-T, Chuang J-C, et al. Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Fish Shellfish Immunol.* 2015;47: 1006–1014. doi:10.1016/j.fsi.2015.11.008
17. Johansson MW, Keyser P, Sritunyalucksana K, Söderhäll K. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture.* 2000;191: 45–52. doi:10.1016/S0044-8486(00)00418-X
18. Tassanakajon A, Somboonwiwat K, Supungul P, Tang S. Discovery of immune



- molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish Shellfish Immunol.* 2013;34: 954–967. doi:10.1016/j.fsi.2012.09.021
19. Li F, Xiang J. Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp. *Fish Shellfish Immunol.* 2013;34: 973–80. doi:10.1016/j.fsi.2012.08.023
  20. Ng TH, Lu CW, Lin SS, Chang CC, Tran LH, Chang WC, et al. The Rho signalling pathway mediates the pathogenicity of AHPND-causing *V. parahaemolyticus* in shrimp. *Cell Microbiol.* 2018;20: 1–12. doi:10.1111/cmi.12849
  21. Siebold CTE, Stannius H. *Lehrbuch der vergleichenden Anatomie der wirbellosen Thiere* (Vol. 1)itle. Veit; 1848.
  22. Sumner AT. The cytology and histochemistry of the digestive gland cells of *Helix*. *Q J Microsc Sci.* 1965;106: 173–192. doi:https://doi.org/10.1242/jcs.s3-106.74.173
  23. Ceccaldi HJ. Anatomy and physiology of digestive tract of Crustaceans Decapods reared in aquaculture. *Actes des Colloq.* 1989;9: 243–259. doi:https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/1486/
  24. Nagasawa S, Nemoto T. Presence of bacteria in guts of marine crustaceans and on their fecal pellets. *J Plankton Res.* 1988;10: 559–564. doi:10.1093/plankt/10.3.559
  25. Al-Mohanna SY, Nott JA. B-cells and digestion in the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (crustacea: Decapoda). *J Mar Biol Assoc United Kingdom.* 1986;66: 403–414. doi:10.1017/S0025315400043034
  26. Kulkarni A, Rombout JHWM, Singh ISB, Sudheer NS, Vlak JM, Caipang CMA, et al. Truncated VP28 as oral vaccine candidate against WSSV infection in shrimp: An uptake and processing study in the midgut of *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.* 2013;34: 159–166. doi:10.1016/j.fsi.2012.10.028
  27. Schulz O, Pabst O. Antigen sampling in the small intestine. *Trends Immunol.* 2013;34: 155–161. doi:10.1016/j.it.2012.09.006
  28. Cao J, Wang Z, Zhang Y, Qu F, Guo L, Zhong M, et al. Identification and characterization of the related immune-enhancing proteins in crab *Scylla paramamosain* stimulated with rhubarb polysaccharides. *Mol Immunol.* 2014;57: 263–273. doi:10.1016/j.molimm.2013.10.003
  29. Jiang Q, Zhou Z, Wang L, Wang L, Yue F, Wang J, et al. A Scallop Nitric Oxide

- Synthase (NOS) with Structure Similar to Neuronal NOS and Its Involvement in the Immune Defense. *PLoS One*. 2013;8: 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0069158
30. Röszer T. The invertebrate midintestinal gland (“hepatopancreas”) is an evolutionary forerunner in the integration of immunity and metabolism. *Cell Tissue Res*. 2014;358: 685–695. doi:10.1007/s00441-014-1985-7
  31. Li S, Zhang X, Sun Z, Li F, Xiang J. Transcriptome Analysis on Chinese Shrimp *Fenneropenaeus chinensis* during WSSV Acute Infection. *PLoS One*. 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0058627
  32. Mohankumar K, Ramasamy P. Activities of membrane bound phosphatases, transaminases and mitochondrial enzymes in white spot syndrome virus infected tissues of *Fenneropenaeus indicus*. *Virus Res*. 2006;118: 130–135. doi:10.1016/j.virusres.2005.12.002
  33. Li X, Cui Z, Liu Y, Song C, Shi G. Transcriptome Analysis and Discovery of Genes Involved in Immune Pathways from Hepatopancreas of Microbial Challenged Mitten Crab *Eriocheir sinensis*. *PLoS One*. 2013;8: 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0068233
  34. Liu X, Ji C, Zhao J, Wu H. Differential metabolic responses of clam *Ruditapes philippinarum* to *Vibrio anguillarum* and *Vibrio splendidus* challenges. *Fish Shellfish Immunol*. 2013;35: 2001–2007. doi:10.1016/j.fsi.2013.09.014
  35. Boone WR, Schoffeniels E. Hemocyanin synthesis during hypo-osmotic stress in the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Comp Biochem Physiol -- Part B Biochem*. 1979;63: 207–214. doi:10.1016/0305-0491(79)90031-2
  36. Sellos D, Lemoine S, Van Wormhoudt A. Molecular cloning of hemocyanin cDNA from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): Structure, evolution and physiological aspects. *FEBS Lett*. 1997;407: 153–158. doi:10.1016/S0014-5793(97)00350-5
  37. Roszer T. Nitric Oxide Synthesis in the Mitochondria of Animal Cells. *The Biology of Subcellular Nitric Oxide*. Netherlands: Springer, Dordrecht; 2012. pp. 1–194. doi:10.1007/978-94-007-2819-6
  38. Ottaviani E, Franchini A, Malagoli D. Inflammatory Response in Molluscs: Cross-

- Taxa and Evolutionary Considerations. *Curr Pharm Des.* 2011;16: 4160–4165. doi:10.2174/138161210794519084
39. Zeng DG, Lei a Y, Chen XH. Cloning, characterization, and expression of the macrophage migration inhibitory factor gene from the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae). *Genet Mol Res.* 2013;12: 5872–5879. doi:10.4238/2013.November.22.15
  40. Zheng Z, Wang F, Aweya JJ, Li R, Yao D, Zhong M, et al. Comparative transcriptomic analysis of shrimp hemocytes in response to acute hepatopancreas necrosis disease (AHPND) causing *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 2018;74: 10–18. doi:10.1016/j.fsi.2017.12.032
  41. Ge Q, Li J, Wang J, Li J, Ge H, Zhai Q. Transcriptome analysis of the hepatopancreas in *Exopalaemon carinicauda* infected with an AHPND-causing strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 2017;67: 620–633. doi:10.1016/j.fsi.2017.06.047
  42. Soonthornchai W, Chaiyapechara S, Klinbunga S, Thongda W, Tangphatsornruang S, Yoocha T, et al. Differentially expressed transcripts in stomach of *Penaeus monodon* in response to AHPND infection analyzed by ion torrent sequencing. *Dev Comp Immunol.* 2016;65: 53–63. doi:10.1016/j.dci.2016.06.013
  43. Zheng Z, Aweya JJ, Wang F, Yao D, Lun J, Li S, et al. Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) related microRNAs in *Litopenaeus vannamei* infected with AHPND-causing strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *BMC Genomics.* 2018;19: 335. doi:10.1186/s12864-018-4728-4
  44. Tyagi A, Saravanan V, Karunasagar I, Karunasagar I. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in tropical shellfish by SYBR green real-time PCR and evaluation of three enrichment media. *Int J Food Microbiol.* 2009;129: 124–130. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.006
  45. Sirikharin R, Taengchaiyaphum S, Sritunyalucksana K, Thitamadee S, Flegel TW, Mavichak R. A new and improved PCR method for detection of AHPND bacteria. Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific (NACA). 2014. pp. 7–9. Available: [http://www.biotec.or.th/th/images/stories/New\\_EMS/AP3\\_PCR\\_detection\\_method](http://www.biotec.or.th/th/images/stories/New_EMS/AP3_PCR_detection_method)

announcement.pdf

46. Zimmermann J, Voss H, Schwager C, Stegemann J, Ansorge W. Automated Sanger dideoxy sequencing reaction protocol. *FEBS Lett.* 1988;233: 432–436. doi:10.1016/0014-5793(88)80477-0
47. Finney DJ. *Probit Analysis*. 32nd ed. Cambridge University. 1971. doi:10.1002/jps.2600600940
48. de Oliveira Cesar JR, Zhao B, Malecha S, Ako H, Yang J. Morphological and biochemical changes in the muscle of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* during the molt cycle. *Aquaculture*. 2006;261: 688–694. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.08.003
49. Bell TA, Lightner D V. *A handbook of normal penaeid shrimp histology*. World Aquaculture Society; 1988.
50. Lightner D V. *Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp*. 2nd. Editi. Lightner D V., editor. Baton Rouge, LO, USA: World Aquaculture Society; 2001. Available: <http://www.was.org/shopping/handbook-of-shrimp-pathology-and-diagnostic-procedures-for-diseases-of-penaeid-shrimp>
51. Barham BYD, Trinder P. An Improved Colour Reagent for the Determination of Blood Glucose by the Oxidase System. *Analyst*. 1972;97: 142–145. doi:10.1039/AN9729700142
52. Roe JH, Bailey JM, Gray RR, Robinson JN. Complete removal of glycogen from tissues by extraction with cold trichloroacetic acid solution. *J Biol Chem*. 1961;236: 1244–1246. doi:10.1016/S0021-9258(18)64157-2
53. Shimojo N, Naka K, Nakajima C, Yoshikawa C, Okuda K, Okada K. Test-Strip Method for Measuring Lactate in Whole Blood. *Clin Chem*. 1992;35: 1992–1994. doi:10.1093/clinchem/35.9.1992
54. Barnes H, Blackstock J. Estimation of lipids in marine animals and tissues: Detailed investigation of the sulphophosphovanilun method for “total” lipids. *J Exp Mar Bio Ecol*. 1973;12: 103–118. doi:10.1016/0022-0981(73)90040-3
55. Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of

- enzymes. *Clin Chem.* 1973;19: 476–482. doi:10.1093/clinchem/19.5.476
56. Richmond W. Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clin Chem.* 1973;19: 1350–1356. doi:10.1093/clinchem/19.12.1350
57. Racotta IS, Hernández-Herrera R. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. *Comp Biochem Physiol -- Part A Physiol.* 2000;125: 437–443. doi:10.1016/S1095-6433(00)00171-9
58. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150: 76–85. doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7
59. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: An RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol.* 2006;7: 1–14. doi:10.1186/1471-2199-7-3
60. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30: 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
61. Ghaffari N, Sanchez-Flores A, Doan R, Garcia-Orozco KD, Chen PL, Ochoa-Leyva A, et al. Novel transcriptome assembly and improved annotation of the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), a dominant crustacean in global seafood mariculture. *Sci Rep.* 2014;4: 7081. doi:10.1038/srep07081
62. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215: 403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
63. Bairoch A, Apweiler R. The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Res.* 2000;28: 45–48. doi:10.1093/nar/28.1.45
64. Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Furumichi M, Tanabe M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res.* 2012;40: 109–114. doi:10.1093/nar/gkr988
65. Gene-Ontology-Consortium. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res.* 2004;32: 258D – 261. doi:10.1093/nar/gkh036

66. Powell S, Forslund K, Szklarczyk D, Trachana K, Roth A, Huerta-Cepas J, et al. EggNOG v4.0: Nested orthology inference across 3686 organisms. *Nucleic Acids Res.* 2014;42: 1–9. doi:10.1093/nar/gkt1253
67. Finn RD, Clements J, Eddy SR. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res.* 2011;39: W29–37. doi:10.1093/nar/gkr367
68. Finn RD, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, et al. Pfam: The protein families database. *Nucleic Acids Res.* 2014;42: D222–D230. doi:10.1093/nar/gkt1223
69. Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol.* 2011;29: 644–52. doi:10.1038/nbt.1883
70. Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods.* 2017;14: 417–419. doi:10.1038/nmeth.4197
71. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 2009;26: 139–140. doi:10.1093/bioinformatics/btp616
72. Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol.* 2010;11. doi:10.1186/gb-2010-11-3-r25
73. Zhang C, Zhang B, Lin L, Zhao S. Evaluation and comparison of computational tools for RNA-seq isoform quantification. *BMC Genomics.* 2017;18: 1–11. doi:10.1186/s12864-017-4002-1
74. Reiner A, Yekutieli D, Benjamini Y. Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinformatics.* 2003;19: 368–375. doi:10.1093/bioinformatics/btf877
75. Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, Oshlack A. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biol.* 2010;11. doi:10.1186/gb-2010-11-2-r14
76. Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa AC, Kanehisa M. KAAS: An automatic

- genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Res.* 2007;35: 182–185. doi:10.1093/nar/gkm321
77. Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, Zuberi K, Badrawi R, Chao P, et al. The GeneMANIA prediction server: Biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res.* 2010;38: 214–220. doi:10.1093/nar/gkq537
78. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Am Assoc Cancer Res Educ B.* 2003;1: 2498–2504. doi:10.1101/gr.1239303.metabolite
79. Albert R. Scale-free networks in cell biology. *J Cell Sci.* 2005;118: 4947–4957. doi:10.1242/jcs.02714
80. Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol.* 2006;7: 1–9. doi:10.1186/1471-2199-7-33
81. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. 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 Res.* 2004;64: 5245–5250. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0496
82. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3. doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034
83. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett.* 2004;26: 509–515. doi:10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47
84. Aranda PS, Lajoie DM, Jorcyk CL. Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis.* 2012;33: 366–369. doi:10.1002/elps.201100335
85. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time

- quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25: 402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262
86. Martinez-Urtaza J, Lozano-Leon A, Viña-Feas A, De Novoa J, Garcia-Martin O. Differences in the API 20E biochemical patterns of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;255: 75–81. doi:10.1111/j.1574-6968.2005.00052.x
87. Kondo H, Tinwongger S, Proespraiwong P, Mavichak R, Unajak S, Nozaki R. Draft Genome Sequences of Six Strains of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Early Mortality Syndrome / Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease Shrimp in Thailand. *Genome Announc*. 2014;2: 2–3. doi:10.1128/genomeA.00221-14.Copyright
88. López-León P, Luna-González A, Escamilla-Montes R, Flores-Miranda MC, Fierro-Coronado JA. Isolation and characterization of infectious *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of AHPND, from the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Lat Am J Aquat Res*. 2016;44: 470–479. doi:10.3856/vol44-issue3-fulltext-5
89. Kumar R, Ng TH, Chang CC, Tung TC, Lin SS, Lo CF, et al. Bile acid and bile acid transporters are involved in the pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Cell Microbiol*. 2020;22. doi:10.1111/cmi.13127
90. Kumar V, Bels L De, Couck L, Baruah K, Bossier P. PirABVP Toxin Binds to Epithelial Cells of the Digestive Tract and Produce Pathognomonic AHPND Lesions in Germ-Free Brine Shrimp. *Toxins (Basel)*. 2019;11: 717. doi:10.3390/toxins11120717
91. Lin SJ, Hsu KC, Wang HC. Structural insights into the cytotoxic mechanism of *Vibrio parahaemolyticus* PirAvp and PirBvp toxins. *Mar Drugs*. 2017;15: 9–12. doi:10.3390/md15120373
92. Obata F, Tanaka S, Kashio S, Tsujimura H, Sato R, Miura M. Induction of rapid and selective cell necrosis in *Drosophila* using *Bacillus thuringiensis* Cry toxin and its silkworm receptor. *BMC Biol*. 2015;13: 1–10. doi:10.1186/s12915-015-0160-2
93. Khiem NM, Takahashi Y, Oanh DTH, Hai TN, Yasuma H, Kimura N. The use of machine learning to predict acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in



- shrimp farmed on the east coast of the Mekong Delta of Vietnam. *Fish Sci.* 2020;86: 673–683. doi:10.1007/s12562-020-01427-z
94. Fontaine CT, Lightner D V. Observations on the process of wound repair in penaeid shrimp. *J Invertebr Pathol.* 1973;22: 23–33. doi:10.1016/0022-2011(73)90005-0
  95. Nguyen T V., Alfaro A, Arroyo BB, Leon JAR, Sonnenholzner S. Metabolic responses of penaeid shrimp to acute hepatopancreatic necrosis disease caused by *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture.* 2020; 736174. doi:10.1016/j.aquaculture.2020.736174
  96. Racotta IS, Palacios E. Hemolymph Metabolic Variables in Response to Experimental Manipulation Stress and Serotonin Injection in *Penaeus vannamei*. *J Aquac Soc.* 1998;29: 1–6. doi:10.1111/j.1749-7345.1998.tb00658.x
  97. Pascual C, Gaxiola G, Rosas C. Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species. *Mar Biol.* 2003;142: 735–745. doi:10.1007/s00227-002-0995-2
  98. Santos EA, Keller R. Regulation of circulating levels of the crustacean hyperglycemic hormone: evidence for a dual feedback control system. *J Comp Physiol B.* 1993;163: 374–379. doi:10.1007/BF00265641
  99. Loret SM. Hemocyte differentiation in the shore crab (*Carcinus maenas*) could be accompanied by a loss of glycogenosynthesis capability. *J Exp Zool.* 1993;267: 548–555. doi:10.1002/jez.1402670510
  100. Sedlmeier D. Mode of action of the crustacean hyperglycemic hormone. *Am Zool.* 1985;25: 223–232. doi:10.1093/icb/25.1.223
  101. Hsieh SL, Ruan YH, Li YC, Hsieh PS, Hu CH, Kuo CM. Immune and physiological responses in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture.* 2008;275: 335–341. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.12.019
  102. Gäde G. Energy metabolism of arthropods and mollusks during environmental and functional anaerobiosis. *J Exp Zool.* 1983;228: 415–429. doi:10.1002/jez.1402280304
  103. Scholnick DA, Burnett KG, Burnnet LE. Impact of Exposure to Bacteria on

- Metabolism in the Penaeid Shrimp *Litopenaeus vannamei*. Biol Bull. 2006;211: 44–49. doi:10.2307/4134576
104. Khimmakthong U, Sukkarun P. The spread of *Vibrio parahaemolyticus* in tissues of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* analyzed by PCR and histopathology. Microb Pathog. 2017;113: 107–112. doi:10.1016/j.micpath.2017.10.028
  105. Kumar V, Sinha AK, Romano N, Allen KM, Bowman BA, Thompson KR, et al. Metabolism and Nutritive Role of Cholesterol in the Growth, Gonadal Development, and Reproduction of Crustaceans. Rev Fish Sci Aquac. 2018;26: 254–273. doi:10.1080/23308249.2018.1429384
  106. Yang ST, Kreutzberger AJB, Lee J, Kiessling V, Tamm LK. The role of cholesterol in membrane fusion. Chem Phys Lipids. 2016;199: 136–143. doi:10.1016/j.chemphyslip.2016.05.003
  107. Yepiz-Plascencia G, Galván TG, Vargas-Albores F, García-Bañuelos M. Synthesis of hemolymph high-density lipoprotein  $\beta$ -glucan binding protein by *Penaeus vannamei* shrimp hepatopancreas. Mar Biotechnol. 2000;2: 485–492. doi:10.1007/s101260000030
  108. Coates CJ, Nairn J. Diverse immune functions of hemocyanins. Dev Comp Immunol. 2014;45: 43–55. doi:10.1016/j.dci.2014.01.021
  109. Boonchuen P, Jaree P, Tassanakajon A, Somboonwiwat K. Hemocyanin of *Litopenaeus vannamei* agglutinates *Vibrio parahaemolyticus* AHPND (VPAHPND) and neutralizes its toxin. Dev Comp Immunol. 2018;84: 371–381. doi:10.1016/j.dci.2018.03.010
  110. Krejčová G, Danielová A, Nedbalová P, Kazek M, Strych L, Chawla G, et al. *Drosophila* macrophages switch to aerobic glycolysis to mount effective antibacterial defense. Elife. 2019;8: 1–22. doi:10.7554/eLife.50414
  111. Chen I-T, Aoki T, Huang Y-T, Hirono I, Chen T-C, Huang J-Y, et al. White Spot Syndrome Virus Induces Metabolic Changes Resembling the Warburg Effect in Shrimp Hemocytes in the Early Stage of Infection. J Virol. 2011;85: 12919–12928. doi:10.1128/JVI.05385-11
  112. Wang X, Li E, Chen L. A Review of Carbohydrate Nutrition and Metabolism in

- Crustaceans. N Am J Aquac. 2016;78: 178–187. doi:10.1080/15222055.2016.1141129
113. Nunan L, Lightner D, Pantoja C, Gomez-Jimenez S. Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Dis Aquat Organ*. 2014;111: 81–86. doi:10.3354/dao02776
  114. Tang QQ, Feng L, Jiang WD, Liu Y, Jiang J, Li SH, et al. Effects of dietary copper on growth, digestive, and brush border enzyme activities and antioxidant defense of hepatopancreas and intestine for young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Biol Trace Elem Res*. 2013;155: 370–380. doi:10.1007/s12011-013-9785-6
  115. Mente E, Coutteau P, Houlihan D, Davidson I, Sorgeloos P. Protein turnover, amino acid profile and amino acid flux in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*: Effects of dietary protein source. *J Exp Biol*. 2002;205: 3107–3122. doi:10.1242/jeb.205.20.3107
  116. Howarth KR, Phillips SM, MacDonald MJ, Richards D, Moreau NA, Gibala MJ. Effect of glycogen availability on human skeletal muscle protein turnover during exercise and recovery. *J Appl Physiol*. 2010;109: 431–438. doi:10.1152/jappphysiol.00108.2009
  117. O’connor JD, Gilbert LI. Aspects of lipid metabolism in crustaceans. *Integr Comp Biol*. 1968;8: 529–539. doi:10.1093/icb/8.3.529
  118. Martin S, Parton RG. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7: 373–378. doi:10.1038/nrm1912
  119. Faust JE, Manisundaram A, Ivanova PT, Milne SB, Summerville JB, Brown HA, et al. Peroxisomes are required for lipid metabolism and muscle function in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*. 2014;9: 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0100213
  120. Rao R, Bing Zhu Y, Alinejad T, Tiruvayipati S, Lin Thong K, Wang J, et al. RNA-seq analysis of *Macrobrachium rosenbergii* hepatopancreas in response to *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Gut Pathog*. 2015;7: 6. doi:10.1186/s13099-015-0052-6
  121. Tassanakajon A, Rimphanitchayakit V, Visetnan S, Amparyup P, Somboonwiwat K, Charoensapsri W, et al. Shrimp humoral responses against pathogens: antimicrobial peptides and melanization. *Dev Comp Immunol*. 2018;80: 81–93.

- doi:10.1016/j.dci.2017.05.009
122. Xu C, Li J, Yang L, Shi F, Yang L, Ye M. Antibacterial activity and a membrane damage mechanism of Lachnum YM30 melanin against *Vibrio parahaemolyticus* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*. 2017;73: 1445–1451. doi:10.1016/j.foodcont.2016.10.048
  123. Junprung W, Supungul P, Tassanakajon A. HSP70 and HSP90 are involved in shrimp *Penaeus vannamei* tolerance to AHPND-causing strain of *Vibrio parahaemolyticus* after non-lethal heat shock. *Fish Shellfish Immunol*. 2017;60: 237–246. doi:10.1016/j.fsi.2016.11.049
  124. Edinger AL, Thompson CB. Death by design: Apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16: 663–669. doi:10.1016/j.ceb.2004.09.011
  125. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*. 2007;32: 37–43. doi:10.1016/j.tibs.2006.11.001
  126. Davies TGE, Field LM, Usherwood PNR, Williamson MS. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life*. 2007;59: 151–162. doi:10.1080/15216540701352042
  127. Kewcharoen W, Srisapoome P. Probiotic effects of *Bacillus* spp. from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on water quality and shrimp growth, immune responses, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND strains). *Fish Shellfish Immunol*. 2019;94: 175–189. doi:10.1016/j.fsi.2019.09.013
  128. Soo TCC, Devadas S, Mohamed Din MS, Bhassu S. Differential transcriptome analysis of the disease tolerant Madagascar-Malaysia crossbred black tiger shrimp, *Penaeus monodon* hepatopancreas in response to acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) infection: Inference on immune gene response and in. *Gut Pathog*. 2019;11: 1–13. doi:10.1186/s13099-019-0319-4
  129. Reis Sousa C. Dendritic Cells as Sensor of Infection. *Immunity*. 2001;14: 495–498. doi:10.1016/S1074-7613(01)00136-4
  130. Bunt S, Hooley C, Hu N, Scahill C, Weavers H, Skaer H. Hemocyte-secreted type IV collagen enhances BMP signaling to guide renal tubule morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Cell*. 2010;19: 296–306. doi:10.1016/j.devcel.2010.07.019

131. Song Q, Chen H, Li Y, Zhou H, Han Q, Diao X. Toxicological effects of benzo(a)pyrene, DDT and their mixture on the green mussel *Perna viridis* revealed by proteomic and metabolomic approaches. *Chemosphere*. 2016;144: 214–224. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.08.029
132. Diaz-Ochoa VE, Jellbauer S, Klaus S, Raffatellu M. Transition metal ions at the crossroads of mucosal immunity and microbial pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4: 1–10. doi:10.3389/fcimb.2014.00002
133. Akbar MA, Tracy C, Kahr WHA, Krämer H. The full-of-bacteria gene is required for phagosome maturation during immune defense in *Drosophila*. *J Cell Biol*. 2011;192: 383–390. doi:10.1083/jcb.201008119
134. Krysko D V., Vanden Berghe T, D’Herde K, Vandenabeele P. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*. 2008;44: 205–221. doi:10.1016/j.ymeth.2007.12.001
135. Yang L, Li X, Qin X, Wang Q, Zhou K, Li H, et al. Deleted in azoospermia-associated protein 2 regulates innate immunity by stimulating Hippo signaling in crab. *J Biol Chem*. 2019;294: 14704–14716. doi:10.1074/jbc.RA119.009559
136. Huang Y, Ma F tong, Ren Q. Function of the MOB kinase activator-like 1 in the innate immune defense of the oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*). *Fish Shellfish Immunol*. 2020;102: 440–448. doi:10.1016/j.fsi.2020.04.067
137. Harvey K, Tapon N. The Salvador-Warts-Hippo pathway - An emerging tumour-suppressor network. *Nat Rev Cancer*. 2007;7: 182–191. doi:10.1038/nrc2070
138. Meignin C, Alvarez-Garcia I, Davis I, Palacios IM. The Salvador-Warts-Hippo Pathway Is Required for Epithelial Proliferation and Axis Specification in *Drosophila*. *Curr Biol*. 2007;17: 1871–1878. doi:10.1016/j.cub.2007.09.062
139. Halme A, Cheng M, Hariharan IK. Retinoids Regulate a Developmental Checkpoint for Tissue Regeneration in *Drosophila*. *Curr Biol*. 2010;20: 458–463. doi:10.1016/j.cub.2010.01.038
140. Liu Y, Beyer A, Aebersold R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell*. 2016;165: 535–550. doi:10.1016/j.cell.2016.03.014
141. David JP, Coissac E, Melodelima C, Poupardin R, Riaz MA, Chandor-Proust A, et al.

- Transcriptome response to pollutants and insecticides in the dengue vector *Aedes aegypti* using next-generation sequencing technology. *BMC Genomics*. 2010;11. doi:10.1186/1471-2164-11-216
142. Seong KM, Coates BS, Pittendrigh BR. Impacts of sub-lethal DDT exposures on microRNA and putative target transcript expression in DDT resistant and susceptible *Drosophila melanogaster* strains. *Front Genet*. 2019;10: 1–11. doi:10.3389/fgene.2019.00045
  143. Tang GH, Xiong Y, Liu Y, Song ZH, Yang Y, Shen GM, et al. The Transcription Factor MafB Regulates the Susceptibility of *Bactrocera dorsalis* to Abamectin via GSTz2. *Front Physiol*. 2019;10: 1–8. doi:10.3389/fphys.2019.01068
  144. Vega-Cabrera A, Cancino-Rodezno A, Porta H, Pardo-Lopez L. *Aedes aegypti* Mos20 cells internalizes cry toxins by endocytosis, and actin has a role in the defense against Cry11Aa toxin. *Toxins (Basel)*. 2014;6: 464–487. doi:10.3390/toxins6020464
  145. Indo HP, Davidson M, Yen HC, Suenaga S, Tomita K, Nishii T, et al. Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. *Mitochondrion*. 2007;7: 106–118. doi:10.1016/j.mito.2006.11.026
  146. Yu BP. Cellular Defenses Against Damage From Reactive Oxygen Species. *Physiol Rev*. 1994;74: 139–162. doi:10.1152/physrev.1994.74.1.139
  147. Duan Y, Liu P, Li J, Li J. cDNA cloning, characterization and expression analysis of peroxiredoxin 5 gene in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*. *Mol Biol Rep*. 2013;40: 6569–6577. doi:10.1007/s11033-013-2702-4
  148. Ji P, Yao C, Wang Z. Reactive oxygen system plays an important role in shrimp *Litopenaeus vannamei* defense against *Vibrio parahaemolyticus* and WSSV infection. *Dis Aquat Organ*. 2011;96: 9–20. doi:10.3354/dao02373
  149. Li K, Zhu X, Wang Y, Zheng S, Dong G. Effect of aerobic exercise intervention on DDT degradation and oxidative stress in rats. *Saudi J Biol Sci*. 2017;24: 664–671. doi:10.1016/j.sjbs.2017.01.040
  150. Ellerton HD, Ellerton NF, Robinson HA. Hemocyanin—a current perspective. *Prog*

- Biophys Mol Biol. 1983;41: 143–248. doi:10.1016/0079-6107(83)90028-7
151. Rao MS, Rajitha B, Pavitra E, Anjaneyulu N. Changes of Copper and Protein Profiles in Hepatopancreas and Hemolymph Tissues During Different Molt Stages of White Shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Biotechnology. 2008;7: 153–156. doi:10.3923/biotech.2008.153.156
  152. Cerenius L, Söderhäll K. Coagulation in invertebrates. J Innate Immun. 2011;3: 3–8. doi:10.1159/000322066
  153. Fagutao FF, Koyama T, Kaizu A, Saito-Taki T, Kondo H, Aoki T, et al. Increased bacterial load in shrimp hemolymph in the absence of prophenoloxidase. FEBS J. 2009;276: 5298–5306. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07225.x
  154. Armstrong LC, Bornstein P. Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis. Matrix Biol. 2003;22: 63–71. doi:10.1016/S0945-053X(03)00005-2
  155. Sun YD, Zhao XF, Kang CJ, Wang JX. Molecular cloning and characterization of Fc-TSP from the Chinese shrimp *Fennerpenaeus chinensis*. Mol Immunol. 2006;43: 1202–1210. doi:10.1016/j.molimm.2005.07.014
  156. Pongsomboon S, Wongpanya R, Tang S, Chalorsrikul A, Tassanakajon A. Abundantly expressed transcripts in the lymphoid organ of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and their implication in immune function. Fish Shellfish Immunol. 2008;25: 485–493. doi:10.1016/j.fsi.2008.07.010
  157. Brinkmann U, Brinkmann E, Gallo M, Scherf U, Pastan I. Role of CAS, a human homologue to the yeast chromosome segregation gene CSE1, in toxin and tumor necrosis factor mediated apoptosis. Biochemistry. 1996;35: 6891–6899. doi:10.1021/bi952829+
  158. Liao C-F, Luo S-F, Li L-T, Lin C-Y, Chen Y-C, Jian M-C. CSE1L/CAS, the cellular apoptosis susceptibility protein, enhances invasion and metastasis but not proliferation of cancer cells. J Exp Clin Cancer Res. 2011;27: 1–12. doi:doi:10.1186/1756-9966-27-15
  159. Wen R, Li F, Xie Y, Li S, Xiang J. A Homolog of the Cell Apoptosis Susceptibility Gene Involved in Ovary Development of Chinese Shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. Biol Reprod. 2012;86: 1–7. doi:10.1095/biolreprod.111.092635

160. Meng Q, Hou L, Zhao Y, Huang X, Huang Y, Xia S, et al. ITRAQ-based proteomic study of the effects of *Spiroplasma eriocheiris* on chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* hemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 2014;40: 182–189. doi:10.1016/j.fsi.2014.06.029
161. Jeong HC, Min JP, Kook WK, Yoon HC, Sun HP, Won GA, et al. Molecular mechanism of hypoxia-mediated hepatic gluconeogenesis by transcriptional regulation. *FEBS Lett.* 2005;579: 2795–2801. doi:10.1016/j.febslet.2005.03.097
162. Hardy KM, Burnett KG, Burnett LE. Effect of hypercapnic hypoxia and bacterial infection (*Vibrio campbellii*) on protein synthesis rates in the Pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* . *Am J Physiol Integr Comp Physiol.* 2013;305: R1356–R1366. doi:10.1152/ajpregu.00519.2012
163. Rosas C, Cuzon G, Gaxiola G, Priol Y Le, Pascual C, Rossignol J, et al. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. *J Exp Mar Bio Ecol.* 2001;259: 1–22. doi:10.1016/S0022-0981(01)00222-2
164. Sanguanrut P, Munkongwongsiri N, Kongkumnerd J, Thawonsuwan J, Thitamadee S, Boonyawiwat V, et al. A cohort study of 196 Thai shrimp ponds reveals a complex etiology for early mortality syndrome (EMS). *Aquaculture.* 2018;493: 26–36. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.04.033
165. Kuwabara K, Matsumoto M, Ikeda J, Hori O, Ogawa S, Maeda Y, et al. Purification and characterization of a novel stress protein, the 150- kDa oxygen-regulated protein (ORP150), from cultured rat astrocytes and its expression in ischemic mouse brain. *J Biol Chem.* 1996;271: 5025–5032. doi:10.1074/jbc.271.9.5025
166. Ross J, Jiang H, Kanost MR, Wang Y. Serine proteases and their homologs in the *Drosophila melanogaster* genome: An initial analysis of sequence conservation and phylogenetic relationships. *Gene.* 2003;304: 117–131. doi:10.1016/S0378-1119(02)01187-3
167. Shi XZ, Zhao XF, Wang JX. Molecular cloning and expression analysis of chymotrypsin-like serine protease from the Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 2008;25: 589–597. doi:10.1016/j.fsi.2008.07.011



168. Bah A, Van Frankenhuyzen K, Brousseau R, Masson L. The *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin: Effects of trypsin and chymotrypsin site mutations on toxicity and stability. *J Invertebr Pathol.* 2004;85: 120–127. doi:10.1016/j.jip.2004.02.002
169. Laycock M V., MacKay RM, Di Fruscio M, Gallant JW. Molecular cloning of three cDNAs that encode cysteine proteinases in the digestive gland of the American lobster (*Homarus americanus*). *FEBS Lett.* 1991;292: 115–120. doi:10.1016/0014-5793(91)80847-V
170. Hu KJ, Leung PC. Food digestion by cathepsin L and digestion-related rapid cell differentiation in shrimp hepatopancreas. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol.* 2007;146: 69–80. doi:10.1016/j.cbpb.2006.09.010
171. Mikulski CM, Burnett LE, Burnett KG. The effects of hypercapnic hypoxia on the survival of shrimp challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. *J Shellfish Res.* 2000;19: 301–311.