



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza".

UNIVERSIDAD DE SONORA

UNIDAD REGIONAL SUR

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

**“Efecto del silenciamiento de HIF-1alpha sobre
la carga viral en músculo de camarón blanco
Litopenaeus vannamei infectado con el WSSV.**

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

PRESENTA:

RAFAEL ROMERO CLARK

EXP. 211203236

NAVOJOA, SONORA

ABRIL DE 2017

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se le de el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Jefe del Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Sonora Unidad Regional Sur (DCQBA-USON,URS)

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de datos contenidos en esta tesis deberá dar crédito al DCQBA-USON, URS., previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del Director de Tesis.

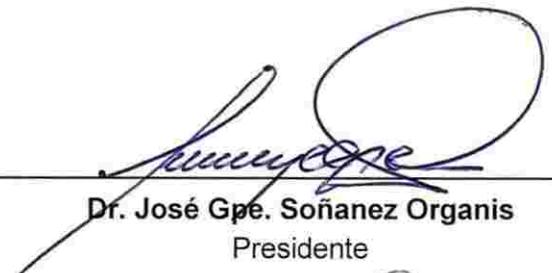


M.C. Ramona Icedo García

Jefe del Depto. de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias

APROBACIÓN

Los miembros del jurado calificador designado para revisar la Tesis Profesional Práctica de Rafael Romero Clark, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.



Dr. José Gpe. Soñanez Organis
Presidente



Dr. Jesús A. Rosas Rodríguez
Secretario



Dra Lilian K. Flores Mendoza
Vocal



Dra. Guadalupe González Ochoa
Suplente

AGRADECIMIENTOS

A mi alma mater Universidad de Sonora.

A mi comité de Tesis por sus atentos comentarios y ayuda.

A mi asesor Dr. José Guadalupe Soñanez Organis por siempre asesorarme, guiarme de la manera correcta y brindarme su amistad.

Al Laboratorio de Fisiología de Invertebrados Marinos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. A los Dres. Silvia Gómez Jiménez, Abdiel Keni Cota Ruiz y M.C. Luis Adrián Gámez Alejo por su participación en este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento del proyecto de Investigación Científica Básica 220496 que permitió la realización del trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres Alma Lorenia Clark y Rafael Romero por su inmenso e incondicional apoyo durante toda mi vida.

A mis hermanos Lorenia y José para demostrarles que nunca hay que rendirse aún en los momentos más difíciles.

A mis compañeros de laboratorio José Francisco, José Arquímedes, Cesar Jeravy, Melissa, Jennifer, José Alberto y Mónica, por siempre brindarme su apoyo y amistad.

A mis amigos del alma Francisco Rosales, Oscar Gutiérrez, Raúl Esparza, por siempre brindarme su apoyo, amistad y los mejores consejos.

CONTENIDO

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	i
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
CONTENIDO	5
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABLAS	8
INTRODUCCIÓN	9
ANTECEDENTES	11
I. Cultivo de camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i>	11
El síndrome de la mancha blanca	11
Efecto Warburg	12
Glucólisis	13
II. Factor inducido por hipoxia 1	15
Estructura y función	15
HIF-1 en camarón	16
III. Silenciamiento de genes	16
RNA de interferencia	16
Silenciamiento de genes en camarón	17
JUSTIFICACION	19
HIPÓTESIS	20
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	20
Manejo de animales	21
Síntesis de dsRNA para la subunidad HIF-1 α	21
Preparación de inóculo del WSSV	21
Silenciamiento de HIF-1 α por dsRNA e infección con el WSSV	22
Aislamiento del DNA genómico	22
Cuantificación de la carga viral de WSSV en músculo de camarón	22
Análisis Estadístico	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
dsRNA para HIF-1 α	25

Aislamiento de DNA genómico	26
Amplificación de VP-28, curva estándar y especificidad de oligonucleótidos	27
Cuantificación del número de copias del WSSV	29
Mortalidad acumulada de camarones	31
CONCLUSIÓN.....	33
BIBLIOGRAFIA.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Esquema general de la glucólisis aerobia y anaerobia.	15
2.	Análisis de integridad y formación de ssRNA sentido, antisentido, y del dsRNA.	26
3.	Análisis de integridad del DNAg extraído de músculo de camarón.	27
4.	Amplificación del fragmento de PCR que codifica para la proteína estructural VP-28.	28
5.	Curva estándar utilizada para la cuantificación de VP-28.	29
6.	Diagrama de temperatura de disociación de VP-28.	29
7.	Número de copias virales del WSSV en el DNAg de músculo.	30
8	Mortalidad acumulada de camarones infectados con el WSSV.	33

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Silenciamiento de genes en camarones infectados con el WSSV.	19

INTRODUCCIÓN

El camarón blanco *Litopenaeus vannamei* es el principal crustáceo cultivado en Sonora, y representa gran parte de su economía. Sin embargo, las infecciones virales son unos de los factores que afectan la camaronicultura, y en donde el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV, por sus siglas en inglés *White Spot Syndrome Virus*) es uno de los principales patógenos, capaz de causar un 100% de mortalidad en granjas camaroneras. La carga viral en camarones infectados puede variar debido a factores de estrés como el cambio drástico de oxigenación, salinidad y temperatura (Vidal y col., 2001; Granja y col., 2003; Guan y col., 2003). Los virus utilizan la maquinaria del huésped para su desarrollo vía glucólisis, ruta pentosas fosfato y oxidación de lípidos (Munger y col., 2006; Munger y col., 2008; Diamond y col., 2010). Estudios recientes han demostrado que el efecto Warburg es inducido por la replicación del WSSV en hemocitos de camarones infectados (Chen y col., 2011).

El efecto Warburg se ha descrito en células tumorales y cancerígenas, como un una reprogramación anormal de la glucólisis, para apoyar su alto requerimiento energético, aumentando así el consumo de glucosa y producción de lactato aún en condiciones normales de oxígeno. A su vez, el efecto Warburg en mamíferos también se ve inducido por infecciones virales incluyendo el virus del papiloma humano (VPH), virus de hepatitis C (VHC), citomegalovirus humano (CVH) (Su y col., 2014).

El factor inducido por hipoxia 1 (HIF-1) es un factor de transcripción que participa en la regulación de genes involucrados en el metabolismo energético anaerobio (Semenza, 2000) y la respuesta inmune (Zinkernagel y col., 2007). HIF-1 consiste de una subunidad α (HIF-1 α) regulada por oxígeno y una constitutiva subunidad β (HIF-1 β) (Semenza, 2001). En camarones sometidos a bajas concentraciones de oxígeno, HIF-1 regula la glucólisis anaerobia mediante la expresión de genes glucolíticos claves (Soñanez-Organis y col., 2011). Recientemente, se demostró que la vía PI3K-Akt-mTOR que activa a HIF-1 en mamíferos, regula el metabolismo energético en hemocitos de camarones infectados con el WSSV (Su y col., 2014). Sin embargo, la función de HIF-1 en camarones expuestos a patógenos no ha sido establecida.

El mecanismo de RNA de interferencia (RNAi) es una estrategia biológica que permite el silenciamiento de genes (Aigner, 2006). Se ha demostrado que el silenciamiento mediante la inducción del mecanismo de RNAi es una herramienta para estudiar la función de genes en camarón, así como el efecto de proteínas estructurales del WSSV

(Attasart y col., 2009; Li y col., 2007; Robalino y col., 2005; Sarathi y col., 2008; Soñanez-Organis y col., 2010) . Por lo anterior, en este trabajo se silenció la subunidad de HIF-1 α por inducción del mecanismo de RNAi en camarones infectados con el WSSV para evaluar su efecto en la carga viral en músculo.

ANTECEDENTES

I. Cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*

El camarón es el producto marino más comercializado en el mundo (Cao, 2012), y el camarón blanco *L. vannamei* es el más cultivado en América y Asia. El camarón blanco es nativo del este del Océano Pacífico, desde el estado de Sonora en México hasta el norte de Perú (FAO, 1980). En el Noroeste de México, la camaronicultura se concreta principalmente en los estados de Sonora y Sinaloa, con una producción anual de hasta 60,617 toneladas (Conapesca, 2016).

Se ha demostrado que el camarón *L. vannamei* tolera cambios de concentración de salinidad y oxígeno disuelto en agua durante su cultivo (Rosas y col., 1999). Sin embargo, la producción de camarón se ve afectada por enfermedades causadas por el virus de la cabeza amarilla (YHV), el virus del síndrome de taura (TSV) y el WSSV (Maldonado y col., 2004).

El síndrome de la mancha blanca

El síndrome de la mancha es una de las principales enfermedades del camarón en el mundo, y es causada por el WSSV. El virus puede causar el 100% de mortalidad de camarones infectados entre los 2-10 días en granjas de camarón, y hay una creciente preocupación por su introducción en la población de camarones silvestres. Los diferentes tejidos de camarón conservan similitud en cuanto a la carga viral en camarones infectados (Oidtmann y Stentiford, 2011). Los factores de estrés como el cambio drástico de oxigenación, salinidad y temperatura, pueden afectar la carga viral (Vidal y col., 2001; Granja y col., 2003; Guan y col., 2003). Los virus utilizan la maquinaria del huésped para su desarrollo vía glucólisis, ruta pentosas fosfato y oxidación de lípidos (Munger y col., 2006; Munger y col., 2008; Diamond y col., 2010).

El WSSV contiene un DNA circular de doble cadena con un peso aproximado de 290 kilo pares de bases (Chen y col., 2002; van Hulten y col., 2001; Yang y col., 2001). El genoma del WSSV ha sido codificado y descrito de tres aislados de camarón de distintas fuentes geográficas (Tailandia, Taiwan y China), los cuales solo difieren en dos regiones polimórficas no relacionadas con virulencia (Mendoza-Cano y Sanchez-Paz, 2013). Los síntomas que causa el WSSV sobre las diferentes especies de camarón son: pequeñas manchas blancas (0.5 – 3 mm) en el exoesqueleto y dentro de la

epidermis, letargia, pérdida de apetito, decoloración rojiza y pérdida de la cutícula (Sanchez-Paz, 2010).

Existen estudios relacionados con los genes y proteínas involucradas en la estructura, proliferación, ciclo de vida y latencia del virus (Wang y Zhang, 2008). Las partículas virales constan mayormente de cinco proteínas, tres de ellas (VP-26, VP-24 y VP-15) que se encuentran en la nucleocápside y dos (VP-28 y VP-19) que se encuentran en la cápside (van Hulten y col., 2011). VP-28 es la proteína más abundante en la cápside y cumple un papel muy importante en la replicación, ya que, induce la adhesión del virus en la pared celular del camarón (Escobedo-Bonilla y col., 2008). A partir de la adhesión, el virus penetra la célula, pierde su envoltura, la nucleocápside se transporta al núcleo, liberando el material genético, en donde comienza la replicación viral (Luo y Reid 200; Wang y col., 1999).

Por otro lado, existen diversos estudios que describen la respuesta molecular, celular metabólica y fisiológica de invertebrados marinos a infecciones virales como la del WSSV (Aoki y col., 2011; Attasart y col., 2009; Chen y col., 2011; He y col., 2005; Kono y col., 2009; Little y col., 2005; Mathew y col., 2007; Salzet, 2001; Wu y col., 2005; Zhao y col., 2007). Además, se ha demostrado que el WSSV induce cambios metabólicos en donde aumenta el consumo de glucosa y se acumula lactato que asemeja al efecto Warburg (Chen y col., 2011).

Efecto Warburg

El efecto Warburg es una respuesta anormal de la glucólisis que en humanos está asociada con células cancerígenas y tumores. En este efecto se afecta la concentración de enzimas y metabolitos glucolíticos, como el aumento en el consumo de glucosa, aumento en la actividad de enzimas glucolíticas y aumento en la concentración de lactato, aun en condiciones de normoxia (Vander Heiden y col., 2009). El efecto Warburg también puede ser inducido por algunos virus, incluyendo el virus del papiloma humano (VPH), citomegalovirus humano (CVH), virus del herpes humano (VHH), virus del hepatitis B y C (VHB y VHC) (Su y col., 2014).

En *Penaeus monodon*, las enzimas claves en el metabolismo de glucosa como aldolasa, glucosa-6-fosfato, fructosa-1,6-bifosfato y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa son afectadas durante las infecciones con el WSSV (Mathew y col., 2007). En *L. vannamei*, se han descrito cambios semejantes al efecto Warburg relacionados con el

metabolismo energético inducidos por el WSSV, demostrando que este virus depende de este efecto para su desarrollo (Chen y col., 2011; Chen y col., 2016; Su y col., 2014). El consumo de glucosa y la concentración de lactato en plasma aumentan junto con la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa a las 12 horas post-infección con el WSSV (Chen y col., 2011). Por otro lado, la inhibición química de la vía de señalización PI3K-Akt-mTOR, usada por células cancerígenas y virus para inducir el efecto Warburg, disminuye la expresión génica y replicación del genoma del WSSV en hemocitos de camarón blanco. Lo anterior, demostró que el efecto Warburg inducido por el WSSV es esencial para satisfacer la replicación del virus (Su y col., 2014).

Glucólisis

La glucólisis es una ruta central del catabolismo de carbohidratos, en la cual diez enzimas convierten una mol de glucosa a dos moles de piruvato, NADH y ATP (Figura 1). El destino metabólico del piruvato y el NADH depende del estado de oxigenación de la célula. Durante una adecuada oxigenación (glucólisis aerobia), el piruvato es metabolizado en el ciclo de Krebs generando NADH, que junto con el NADH producido en glucólisis, se reoxidan en la cadena de transporte de electrones para producir ATP a través de la fosforilación oxidativa. Cuando el oxígeno disminuye (glucólisis anaerobia), el NADH no puede ser reoxidado por lo que es usado para reducir el piruvato a lactato, convirtiéndose así en la principal ruta de producción de ATP.

La acumulación de lactato en crustáceos sometidos a hipoxia (Gäde, 1984; Racotta y col., 2002; Soñanez-Organis y col., 2009) e identificación de enzimas glucolíticas (Mulkiewicz y col., 1987; Stetten y Goldsmith, 1981; Thébault y Le Gal, 1978) han revelado la importancia de la glucólisis anaerobia en estos organismos. En camarón blanco sometido a bajas concentraciones de oxígeno, se ha demostrado que la glucólisis anaerobia es regulada a nivel transcripcional por el factor inducido por hipoxia 1 (Soñanez-Organis y col., 2011; Soñanez-Organis y col., 2010; Soñanez-Organis y col., 2012).

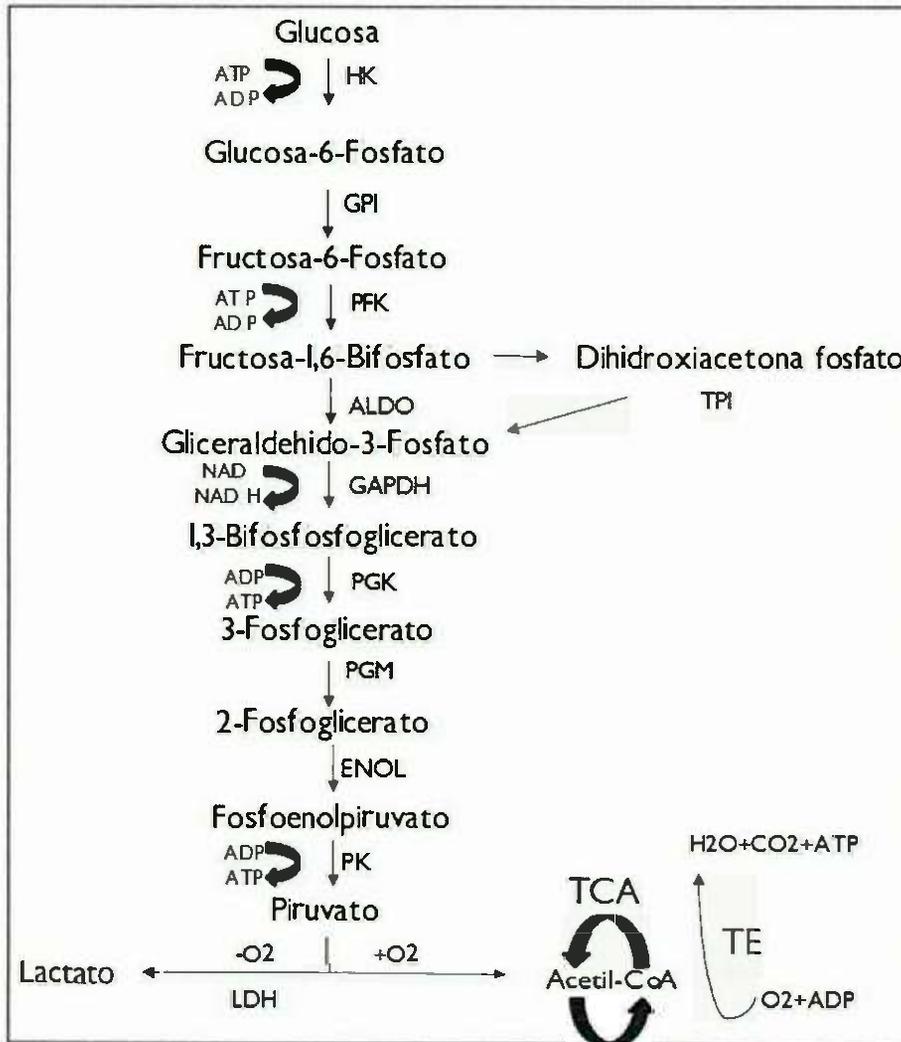


Figura 1. Esquema general de la glucólisis aerobia y anaerobia. Abreviaciones: Hexocinasa (HK), fosfoglucosa isomerasa (GPI), fosfofructocinasa (PFK), aldolasa (ALDO), trifosfato isomerasa (TPI), gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), fosfoglicerato cinasa (PGK), fosfoglicerato mutasa (PGM), enolasa (ENO), piruvato cinasa (PK), lactato deshidrogenasa (LDH), ciclo de Krebs (TCA) y transporte de electrones (TE).

II. Factor inducido por hipoxia 1

Estructura y función

El factor inducido por hipoxia 1 es un heterodímero compuesto de una subunidad α (HIF-1 α) regulada por oxígeno y una subunidad β (HIF-1 β) que se expresa constitutivamente (Semenza, 2001). Ambas subunidades de HIF-1 (α y β) son miembros de la familia de proteínas de bucle hélice vuelta hélice / Per-ARNT-Sim (bHLH / PAS) (Semenza, 1998), caracterizado por contener dominios conservados de bHLH y PAS. Los dominios bHLH son responsables de oligomerización y unión al DNA, mientras que los dominios PAS son también implicados en la dimerización y transactivación (Semenza, 2001). Los dominios PAS son sensores a cambios en la tensión de oxígeno, potencial redox o intensidad de luz, y también median la interacción proteína-proteína o unión a ligandos (Taylor y Zhulin, 1999).

HIF-1 α tiene un dominio de degradación altamente sensible al oxígeno (ODD: *Oxygen-Dependent Degradation Domain*) que regula su estabilidad. Bajo condiciones normales de oxígeno (normoxia), el dominio ODD es hidroxilado por prolin-hidroxilasas, permitiendo su interacción con la proteína von Hippel-Lindau (pVHL). La pVHL es un componente del complejo E3 ubiquitin ligasa que es encargada de ubiquitinar a HIF-1 α , conduciéndolo a ser degradado por los proteosomas (Fedele y col., 2002; Pouyssegur y col., 2006). En contraste, en condiciones de bajo oxígeno (hipoxia) la hidroxilación de HIF-1 α disminuye provocando su estabilización y translocación al núcleo donde lleva a cabo su función (Semenza, 2001).

HIF-1 regula la respuesta a hipoxia mediante la coordinación de un mecanismo transcripcional que asegura un óptimo funcionamiento metabólico, y de adaptación vascular a bajas concentraciones de oxígeno (Semenza, 1998). HIF-1 regula una gran variedad de genes que participan en la respuesta celular incluyendo la glucólisis, eritropoyesis y angiogénesis (Semenza, 2001). HIF-1 reconoce específicamente cajas de regulación cis llamados elementos de respuesta a hipoxia (HREs, por *Hypoxia Response Elements*) presentes en las regiones promotoras y potenciadoras de los genes. Entre los genes que regula HIF-1 se encuentran los relacionados al metabolismo energético como lo son transportadores de glucosa (GLUT-1 y GLUT-4) y enzimas glucolíticas (aldosa A, enolasa 1, lactato deshidrogenasa A, fosfofructoquinasa L y fosfoglicerato quinasa 1) (Semenza, 1998).

HIF-1 en camarón

Los estudios respecto a la función, caracterización molecular y expresión del mRNA de ambas subunidades de HIF-1 en crustáceos son limitadas (Cai y col., 2014; Hardy y col., 2012; Piontkivska y col., 2011; Soñanez-Organis y col., 2009). En camarón blanco, se conoce que ambas subunidades de HIF-1 contienen dominios importantes para su función y regulación, y que ambas subunidades son expresadas de manera tejido-específico durante hipoxia (Soñanez-Organis y col., 2009).

Además, el silenciamiento de los genes que codifican para las subunidades de HIF-1 en camarones sometidos a hipoxia demostró que su función es esencial para la promover la glucólisis anaerobia en este organismo (Soñanez-Organis y col., 2011; Soñanez-Organis y col., 2012). Con los resultados anteriores se demuestra que HIF-1 juega un papel clave en el metabolismo energético anaerobio de camarones sometidos a hipoxia. Sin embargo, se desconoce si la glucólisis promovida por la infección del WSSV (efecto Warburg) es inducida por HIF-1, y menos aún si es esencial para la replicación del virus. Para lo anterior, una de las herramientas que se ha utilizado para evaluar la función de proteínas en camarón es el silenciamiento de genes (Soñanez y col., 2010, 2011, 2012; García y col., 2010; Lugo y col., 2006; Maningas y col., 2008; Tiu y Chan, 2007; Treerattrakook y col., 2008).

III. Silenciamiento de genes

RNA de interferencia

El silenciamiento de genes es una forma de regulación genética y es un término utilizado para describir la inactivación de un gen, ya sea a nivel de DNA o de RNA. La eliminación de genes permite investigar los efectos de su ausencia en diferentes condiciones y su importancia para la sobrevivencia de los organismos. El silenciamiento del RNA es un mecanismo novedoso que limita los niveles de transcritos, ya sea por la supresión de la traducción o por la activación de secuencias específicas que degradan el RNA (Leung y Whittaker, 2005).

Un mecanismo eficiente y conservado de silenciamiento de genes es el mecanismo de RNA de interferencia (RNAi), el cual es dirigido por la presencia de RNA de doble cadena (dsRNA). Dentro de la célula, el dsRNA es cortado en pequeños RNAs de interferencia (siRNA, por *small interfering RNA*) de 20-23 pb por una RNasa tipo III

llamada DICER (Hamilton y Baulcombe, 1999). Estos siRNA inducen la formación de un complejo de proteínas denominado RISC (por *RNA-Induced Silencing Complex*), el cual contiene una helicasa que se encarga de separar las dos cadenas del siRNA. Una vez que RISC se queda con una cadena, una proteína homóloga a DICER con actividad de nucleasa se encarga de degradar el mRNA complementario a la secuencia del siRNA (Elbashir y col., 2001; Tabara y col., 1998).

En mamíferos, insectos, plantas y otros organismos, la aplicación del RNAi ha permitido el análisis sistemático de la expresión y función de genes. Además, durante el mecanismo del RNAi la presencia de dsRNA específicos lleva a la eliminación de su mRNA homólogo (Hannon, 2002), dando como resultado una herramienta para investigar la función de la proteína correspondiente.

Silenciamiento de genes en camarón

En las últimas décadas el RNAi ha sido utilizado en camarón como una poderosa herramienta para estudiar la función de genes (Soñanez y col., 2010, 2011, 2012; García y col., 2010; Lugo y col., 2006; Maningas y col., 2008; Tiu y Chan, 2007; Treerattrakook y col., 2008) y activación de la respuesta antiviral innata en invertebrados marinos (Charoensapsri y col., 2009; Kim y col., 2007; Rijiravanich y col., 2008; Robalino y col., 2004; Tirasophon y col., 2005; Tirasophon y col., 2006; Westernberg y col., 2005) (Tabla 1).

En estudios recientes, se ha demostrado exitosamente que el silenciamiento de las subunidades de HIF-1, inducido por dsRNA, disminuye la concentración de glucosa y lactato en tejidos de camarones sometidos a hipoxia, sin afectar estos parámetros (Soñanez y col., 2010). Por lo tanto, en este trabajo utilizaremos el mecanismo del RNAi para eliminar los mRNAs para la subunidad de HIF-1 α de *L. vannamei* y así investigar su importancia en la replicación del WSSV en estos organismos.

Tabla 1. Silenciamiento de genes en camarones infectados con el WSSV.

Especie de camarón	Gen silenciado	Efecto	Referencia
Genes del WSSV			
<i>L. vannamei</i>	VP-24, VP-28, DNA pol.	Disminución de carga viral	(Wu y col., 2007)
<i>P. monodon</i>	VP-28	Disminución de carga viral	(Xu y col., 2007)
<i>P. monodon</i>	VP-15, VP-28	Disminución de carga viral	(Westenberg y col., 2005)
<i>Penaeus japonicus</i>	VP-28	Disminución de carga viral	(Sarathi y col., 2008)
<i>L. vannamei</i>	VP-19	Disminución de carga viral	(Robalino y col., 2005)
<i>P. monodon</i>	rr2	Disminución de carga viral	(Attasart y col., 2009)
Genes endógenos del camarón			
<i>L. vannamei</i>	HIF-1 α y β	Disminución de glucosa y lactato, en hipoxia	(Soñanez-Organis y col., 2010)
<i>P. monodon</i>	Rab7	Disminución de carga viral	(Ongvarrasopone y col., 2008)
<i>L. vannamei</i>	β -Integrina	Disminución de carga viral	(Zhang y col., 2014)
<i>L. vannamei</i>	Translocasa adenina nucleotídica	Disminución de carga viral	(Ma y col., 2014)
<i>P. monodon</i>	Receptor de Laminina	Disminución de carga viral	(Liu y col., 2016)

JUSTIFICACION

El camarón blanco *L. vannamei* es la principal especie de cultivo en granjas camaroneras en el estado de Sonora, donde el WSSV es el principal patógeno que afecta su cultivo. Estudios recientes, demuestran que el efecto Warburg inducido por el WSSV es esencial para su replicación en hemocitos de camarones infectados. El efecto Warburg es una respuesta anormal de la glucólisis, en donde aumenta el consumo de glucosa y se acumula lactato aún en condiciones normales de oxígeno. Por otro lado, HIF-1 regula la glucólisis en camarones sometidos a bajas concentraciones de oxígeno. Sin embargo, la participación de HIF-1 en la glucólisis inducida por el WSSV aún se desconoce. Por lo tanto, este trabajo plantea evaluar la carga viral del WSSV en camarones con HIF-1 α silenciado por medio del mecanismo de RNAi.

HIPÓTESIS

El silenciamiento de HIF-1 α disminuye la carga viral del WSSV en camarón blanco *L. vannamei* infectado.

OBJETIVO GENERAL

Cuantificar la carga viral del WSSV en músculo de camarón *L. vannamei* silenciados con HIF-1 α .

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Silenciar HIF-1 α por medio de RNA de doble cadena en camarones infectados con el WSSV.
- Cuantificar la carga viral de WSSV en musculo de *L. vannamei* por medio de PCR cuantitativo.

MATERIALES Y METODOS

Manejo de animales

Se utilizaron camarones juveniles de *L. vannamei* (14 ± 2 gr) libres de patógenos específicos (SPF, por *Specific Pathogen Free*) que fueron proporcionados de una granja camaronera cerca de Hermosillo, en el estado de Sonora, México. Los camarones se trasladaron al Laboratorio de Fisiología de Invertebrados Marinos de la Coordinación de Organismos de Origen Animal del Centro de investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. en Hermosillo, Sonora. Posteriormente, los camarones se aclimataron 4 semanas en tanques de 500 L con a 28°C, 35 ppm de salinidad, luz controlada, aeración constante y alimentados *libitu* con camaronina 35 (Purina).

Síntesis de dsRNA para la subunidad HIF-1 α

El dsRNA para HIF-1 α fue sintetizado como se reporta previamente (Soñanez-Organis y col., 2010). Brevemente, la cadena sencilla de RNA (ssRNA) para HIF-1 α fue generada por transcripción *in vitro* de un fragmento de PCR clonado en el pGEM-T Easy (Promega), utilizando las RNA polimerasas SP6 y T7 del kit RiboMaxTm Large Scale RNA Production Systems SP6-T7 (Promega). El dsRNA fue obtenido mezclando los dos ssRNA, e incubados a 95°C por 10 minutos y lentamente dejarlas enfriar a temperatura ambiente (25°C) durante 20 minutos.

La cuantificación de los ssRNA y dsRNA se realizó por espectrofotometría a 260 nm utilizando el NanoDrop 200 (Thermofisher). Por otro lado, la integridad de los ssRNA y formación del dsRNA se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% teñido con SYBR Safe (Invitrogen).

Preparación de inóculo del WSSV

El inóculo del WSSV se preparó a partir de tejido previamente infectado con el virus. Primeramente, el tejido se homogenizó en buffer de sales (TRIS-NaCl: Tris 20 mM; NaCl 400 mM; pH = 7.4), por periodos de 15 segundos hasta observar una masa uniforme y pastosa. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 10,000 rpm por 9 minutos a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un microtubo nuevo. Finalmente, el sobrenadante se filtró usando filtros estériles de 0.8 μ y almacenados a -80°C para su posterior uso.

Silenciamiento de HIF-1 α por dsRNA e infección con el WSSV

Los camarones fueron divididos en los siguientes grupos: 1) controles sin ningún reto experimental (n=10); 2) inoculados con WSSV (n=30); y 3) silenciados con dsRNA HIF-1 α e infectados con WSSV (n=30). Los camarones fueron inoculados intramuscularmente con 100 μ L de inóculo del WSSV para el grupo 2, mientras que para el grupo 3 se inyectaron simultáneamente con 15 μ g de dsRNA HIF-1 α y 100 μ L de inóculo del WSSV.

Se monitoreo la mortalidad acumulativa a las 24, 48 y 72 horas post-inyección (grupo 2 y 3) y se colectaron diferentes tejidos (branquias, hepatopáncreas y músculo) en los camarones que sobrevivieron. Los tejidos fueron colectados en microtubos para inmediatamente ser congelados por inmersión en nitrógeno líquido y finalmente ser almacenados a -80°C para su posterior uso.

Aislamiento del DNA genómico

El DNA genómico (DNAg) se extrajo a partir de músculo de camarón utilizando el kit de Genomic DNA Minitissue (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Primeramente, se homogenizaron 30 mg de músculo en un politron PT 10-35 (Kinematik), se centrifugo y se obtuvo un sobrenadante que fue incubado durante 2 horas a 55°C con buffer de digestión conteniendo Proteinasa K. Posteriormente, el sobrenadante se colocó en las columnas provistas por el kit para la unión del DNAg a la membrana. Finalmente, la membrana fue lavada con etanol al 70% y el DNAg fue eluido con agua tridestilada libre de nucleasas.

La concentración de DNAg se obtuvo por espectrofotometría utilizando el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) a una longitud de onda de 260 y 280 nm. Todos los DNAg fueron diluidos a 25 ng/ μ L para su posterior uso en el PCR cuantitativo (qPCR). La integridad de cada DNAg fue evaluada por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con SYBR Safe (Invitrogen) y visualizados en el foto documentador ChemiDoc Touch Imaging System (BIO-RAD).

Cuantificación de la carga viral de WSSV en músculo de camarón

La cuantificación de la carga viral del WSSV en músculo de camarón se realizó por medio de qPCR, siguiendo la metodología descrita por (Mendoza-Cano y Sanchez-Paz,

2013). Primeramente, se amplificó por medio de PCR punto final un fragmento del gen que codifica para la proteína estructural VP-28 del WSSV. Para la reacción de PCR se mezclaron 12 µL de SuperMix (Invitrogen), 75 ng de DNAg, 1 µL (20 mM) del oligonucleótido sentido VP-28-140 Fw (5'-AGG TGT GGA ACA ACA CAT CAA G-3') y 1 µL (20 mM) del oligonucleótido antisentido VP-28-140 Rv (5'-TGC CAA CTT CAT CCT CAT CA-3'). La mezcla fue colocada en el termociclador Veriti 100 (BIO-RAD) con las siguientes condiciones: 95°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y una extensión final de 72°C por 7 minutos.

Los productos de PCR se evaluaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.2 % teñidos con SYBR Safe (Invitrogen) y purificados utilizando el kit Illustra GFX PCR DNA (GE HealthCare). A partir de cada fragmento de PCR purificado se realizaron curvas de calibración usando diluciones seriadas 1:10 de una concentración inicial de 18.8 ng/µL a 1.88x10⁻⁸ ng/µL.

La cuantificación de carga viral se realizó por qPCR en el equipo Step One Real Time PCR System (Applied Biosystems). Se realizaron 2 reacciones de PCR por cada DNAg extraído a un volumen final de 15 µL con 7.5 µL de Master Mix, 0.1 µL de cada oligonucleótido (20 mM), 50 ng de DNAg y 5.3 µL de agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 63°C por 30 segundos. La etapa de disociación se llevó a cabo: 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos y 95°C por 15 segundos. En cada uno de las corridas se incluyó un negativo y la curva estándar del fragmento de PCR de VP-28.

El número de copias del WSSV se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\bullet \quad \#Copias = \frac{(Masa) \times (6.022 \times 10^{23})}{(Longitud \times 10^9) \times (650)}$$

En donde:

- Masa = cantidad de DNA en nano gramos.
- Longitud = tamaño en pares de bases del amplicón.
- 6.022x10²³ = Número de Avogadro
- Longitud = Tamaño en pares de bases del amplicón
- 1x10⁹ = Conversión a nano gramos
- 650= Peso promedio por par de base en Daltons

Análisis Estadístico

Se utilizó un diseño estadístico completamente al azar y los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA). Se comprobó la normalidad de los datos se sometieron con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y para evaluar diferencias entre cada tratamiento se usó la prueba de comparación múltiple de Duncan a un nivel de probabilidad del 95%, usando el software estadístico NCSS (2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

dsRNA para HIF-1 α

La integridad y la formación de las cadenas sencillas para HIF-1 α , fueron monitoreados por electroforesis en gel de agarosa (Figura 2). Las bandas correspondientes a los ssRNAs se observan íntegras y presentan un patrón de migración diferente al del dsRNA, demostrando la formación del dsRNA necesario para la inducción del mecanismo de RNAi en camarones.

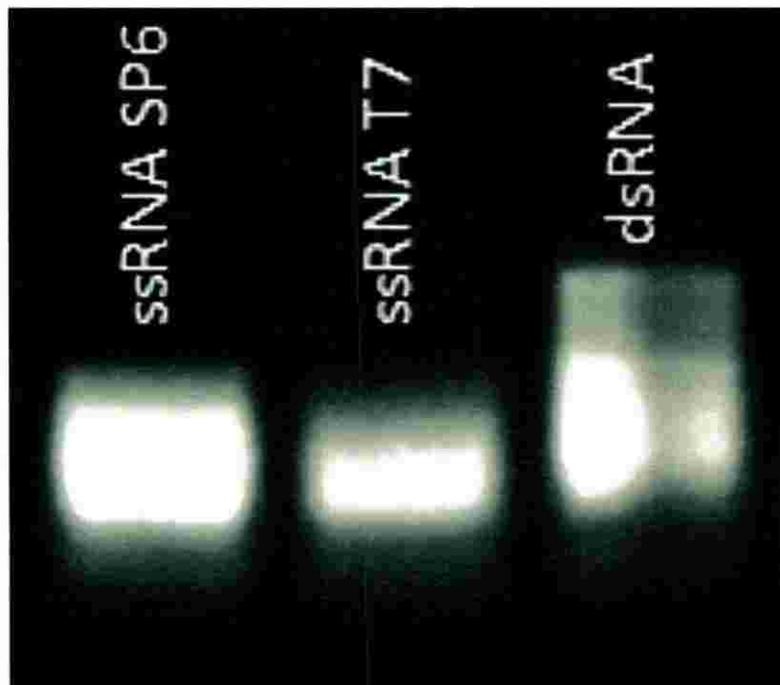


Figura 2. Análisis de integridad de los ssRNA, y dsRNA sintetizados. Gel de agarosa al 1.2% teñido con SYBR Safe.

Aislamiento de DNA genómico

La integridad de los DNAg extraídos de músculo fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa. Se evaluaron 3 muestras de DNAg representativas de cada grupo experimental, en las cuales se observa una banda bien definida que demuestra que los DNAg extraídos están íntegros (Figura 3). Por otro lado, se obtuvo una relación 260/280 de 1.90 ± 0.5 en la cuantificación que demuestra la pureza del DNAg.

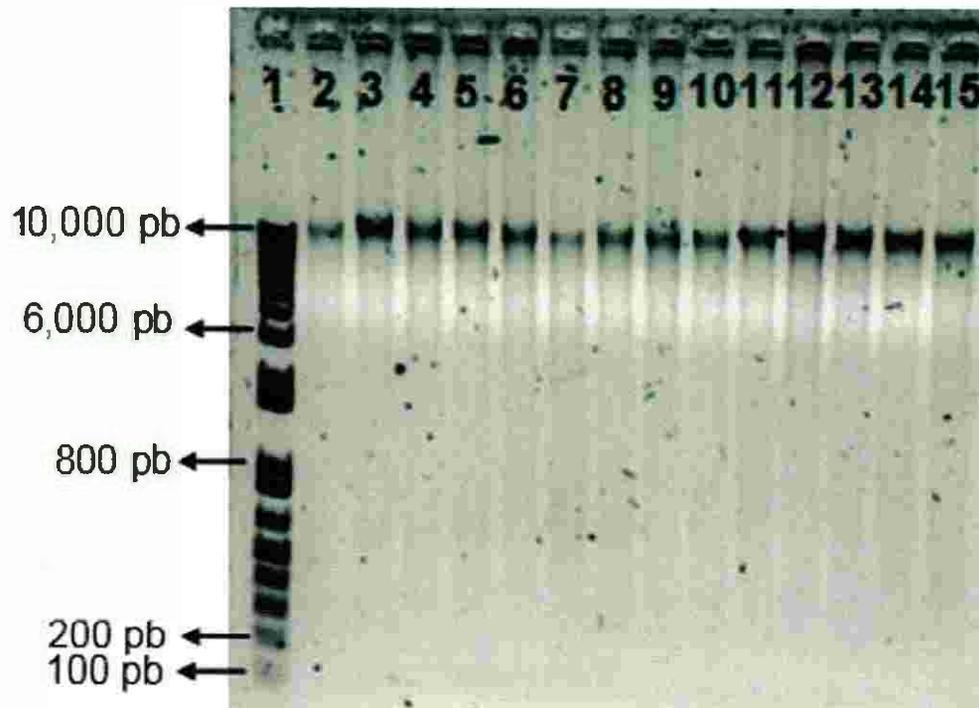


Figura 3. Análisis de integridad del DNAg extraído de músculo de camarón. Gel de agarosa al 1.2% teñido con SYBR Safe. Carril 1 marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder; carril 2-3: Grupo control; carril 4-6: Grupo WSSV día 1; carril 7-8: Grupo WSSV día 2; carril 9-10: Grupo WSSV+dsRNA día 1; carril 11-12: Grupo WSSV+dsRNA día 2; carril 13-15: Grupo WSSV+dsRNA día 3.

Amplificación de VP-28, curva estándar y especificidad de oligonucleótidos

Primeramente, a partir de PCR punto final se obtuvo un amplicón de 140 pb que corresponde a un fragmento del gen que codifica para la proteína VP-28 (Figura 4) y que corresponde a lo reportado por Mendoza-Cano y Sánchez-Paz, 2013. A partir del producto de PCR y mediante qPCR, se obtuvo una curva estándar con una eficiencia de amplificación del 99.005% y una R^2 de 1 (Figura 5) que demuestra la reproducibilidad del experimento.

Por otro lado, la curva de disociación del producto amplificado por qPCR mostró un solo pico y una sola temperatura de disociación de $\sim 78^\circ\text{C}$ (Figura 6) demostrando la especificidad de los oligonucleótidos. Todos los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por (Mendoza-Cano y Sanchez-Paz, 2013), y demuestran que las condiciones del qPCR son las óptimas para la cuantificación del número de copias del WSSV.

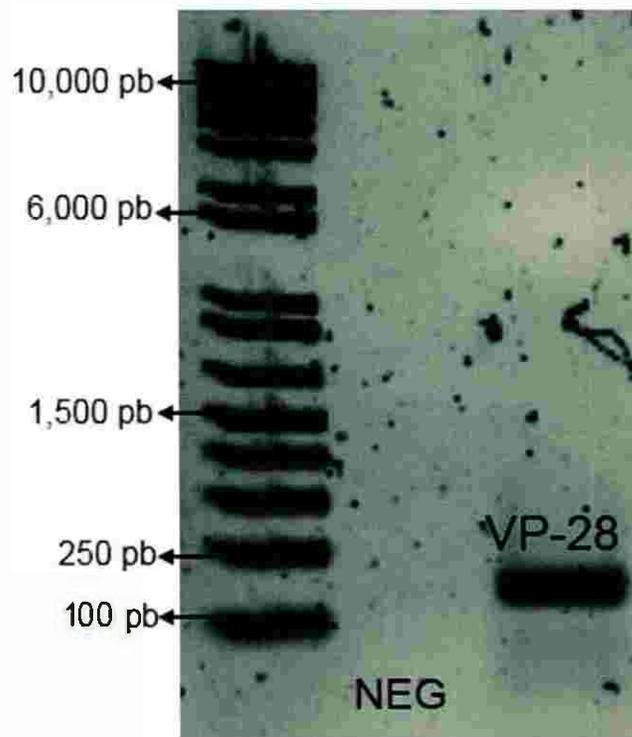


Figura 4. Amplificación del fragmento de PCR que codifica para la proteína estructural VP-28. Gel de agarosa al 1.2% teñido con SYBR Safe.

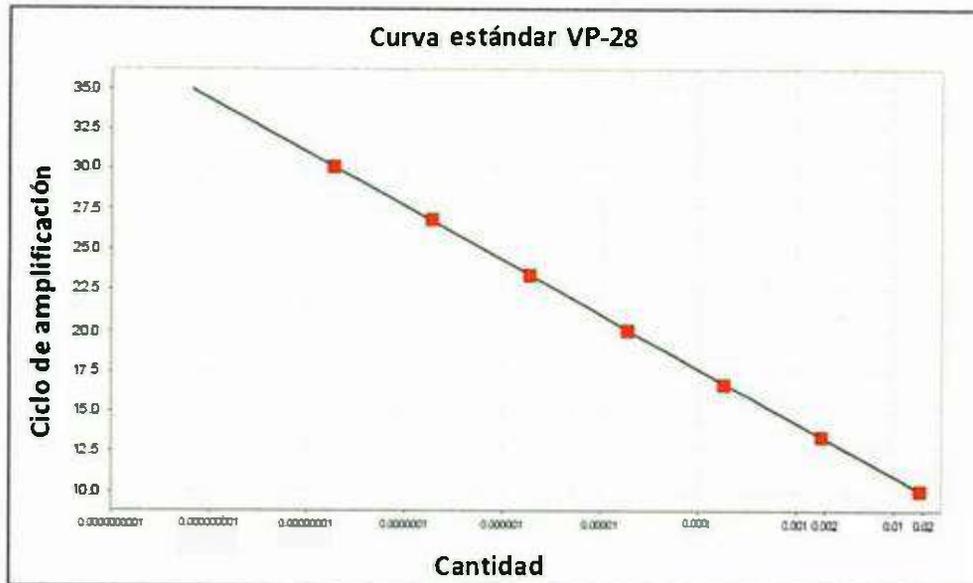


Figura 5. Curva estándar utilizada para la cuantificación de VP-28. Los puntos rojos en la tabla muestran el ciclo en el cual es detectada la amplificación de cada punto de la curva estándar.

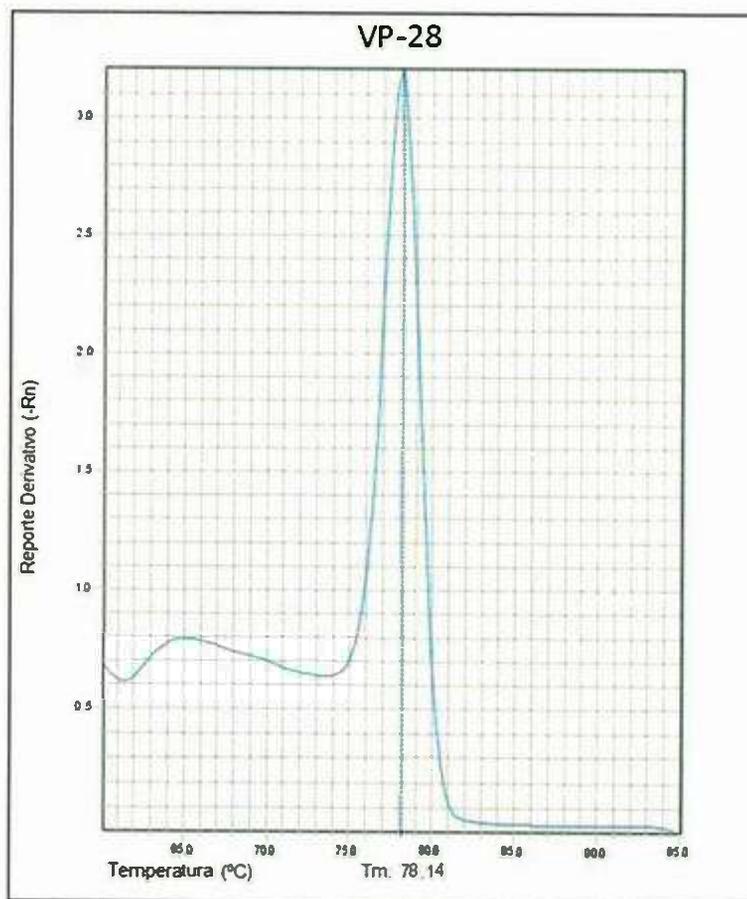


Figura 6. Diagrama de temperatura de disociación de VP-28.

Cuantificación del número de copias del WSSV

El número de copias del WSSV en músculo de camarones a las 24 horas fue 52.2 veces menor a las 48 horas del grupo WSSV (Figura 7). En contraste, en camarones inoculados con el WSSV+dsRNA no se detectaron copias del WSSV a las 24 horas post-inyección y el número de copias del WSSV disminuyó 91.2 y 4.2 veces a las 48 y 72 horas post-inyección, respectivamente, comparado a las 48 horas del grupo inyectado con el WSSV. A las 72 horas en el grupo WSSV+dsRNA la carga viral aumentó 2879.1 y 21.5 veces, respectivamente, en comparación a las 24 y 48 horas, esto se puede deber a la eficiencia del RNAi, la relación al tamaño del transcrito, tamaño del dsRNA, su concentración y el tiempo transcurrido de la inyección del dsRNA (Fire y col., 1998).

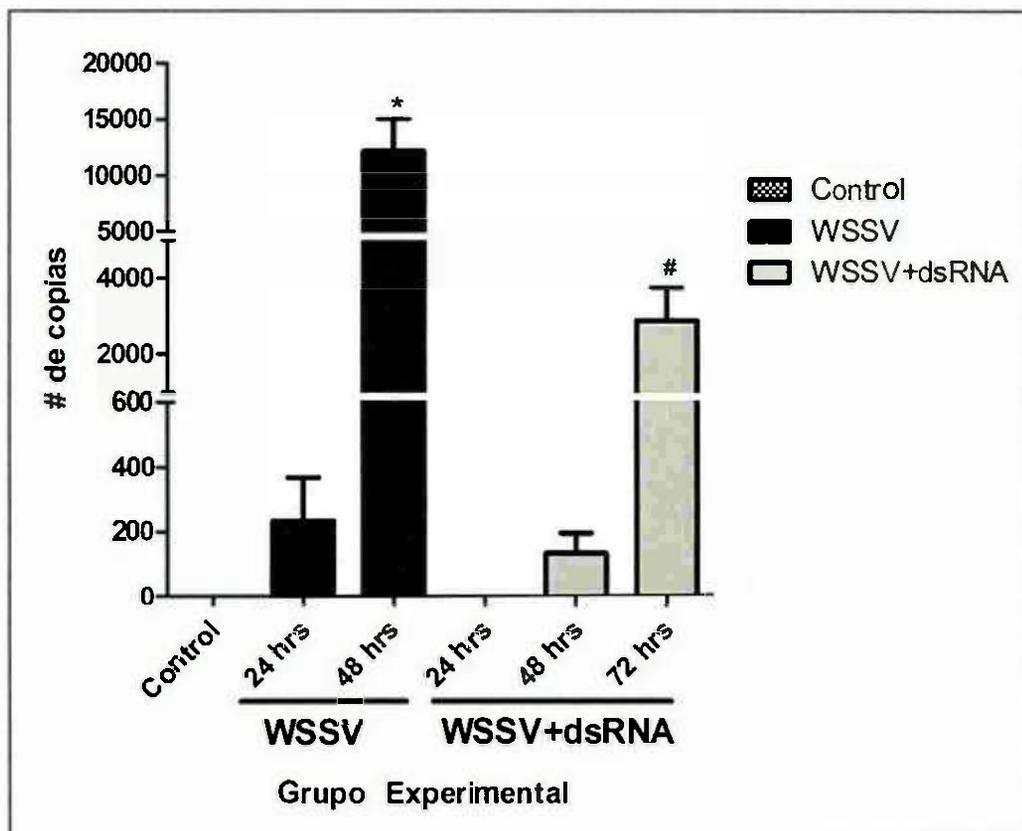


Figura 7. Número de copias virales en músculo camarón a las 24, 48 y 72 horas post-tratamiento. El asterisco muestra diferencias significativas entre el grupo WSSV a las 48 horas y el grupo WSSV+dsRNA a las 24, 48 y 72 horas. El símbolo gato muestra diferencias significativas entre el grupo WSSV+dsRNA a las 72 horas, comparado a las 24 y 48 horas del mismo grupo.

El silenciamiento de genes por el RNAi en camarón ha sido de gran ayuda en la investigación en infecciones virales, comprendiendo el sistema de defensa de dicho

modelo y de las estrategias virales para la replicación (Sagi y col., 2013). En *L. vannamei*, se han silenciado genes que codifican para proteínas del WSSV (rr2, DNA polimerasa, VP-26 y VP-28) provocando una disminución de la infección. Además, en camarón *Penaeus japonicus* se silenció la proteína estructural VP-28, provocando una disminución de copias virales. (Xu y col., 2007).

No solo se ha demostrado que el silenciamiento de proteínas estructurales del virus disminuye la infección por el WSSV. También se han silenciado genes propios del camarón, que se ven involucrados con la replicación de este virus. En camarón *P. monodon*, se ha demostrado que el silenciamiento de PmRab7, un receptor de la proteína estructural VP-28 del WSSV, disminuye la infección del WSSV (Attasart y col., 2009; Sritunyalucksana y col., 2006). Además, el receptor laminina en *P. monodon* se neutralizó, provocando un retraso en la mortalidad del camarón en la infección por el WSSV (Liu y col., 2016). También, hay una disminución de la infección del WSSV por el silenciamiento del receptor integrina- β , el cual se une a la proteína estructural VP-187 del WSSV, en camarón *Marsupenaeus japonicus* (Li y col., 2007). Además, en este mismo modelo se silenció el VDAC, disminuyendo la mortalidad de camarones después de la infección, y se asocia con el efecto Warburg en camarones después de la infección (Chen y col., 2011).

Como se mencionó anteriormente, HIF-1 regula la glucólisis anaerobia en camarón blanco sometido a hipoxia mediante la inducción de genes que codifican para enzimas claves de la glucólisis como HK y LDH (Soñanez-Organis y col., 2011; Soñanez-Organis y col., 2010; Soñanez-Organis y col., 2012). Estudios recientes, demuestran que el WSSV requiere del efecto Warburg para favorecer la replicación en hemocitos de camarón blanco. En hemocitos de camarón blanco, la infección con el WSSV aumenta la actividad de enzimas (HK, GPI, F16P, ALDO, TPI, G3P2, ENO y PK) y metabolitos glucolíticos (GLU, DHAP, GA3P, 3PG, 2PG, PEP y Piruvato) a las 12 horas post-infección (Su y col., 2014). Además, (Chen y col., 2016) demostraron que en las primeras etapas de la infección con el WSSV también hay un aumento en la actividad de enzimas (PFK, G6PDH, PK, LDH) y metabolitos glucolíticos (G6P, F6P, F16BP, PEP, Piruvato).

Por otro lado, vía PI3K-Akt-mTOR, una vía usada por células cancerígenas y virus que activa el efecto Warburg en mamíferos, regula la expresión de genes y replicación del genoma del WSSV en hemocitos de camarón blanco. En varios tipos de

cánceres de humanos, se ha demostrado que la vía PI3K-Akt-mTOR se encarga de mediar la regulación y activación de HIF-1 α (Mottet y col., 2003; Shafee y col., 2009; Zhong y col., 2000). Resultados obtenidos en nuestro grupo de trabajo demuestran que el silenciamiento de HIF-1 α disminuye el consumo de glucosa y producción de lactato en tejidos de camarones infectados con el WSSV. Además, la expresión génica y actividad enzimática de la LDH, enzima que se encarga de reducir el piruvato a lactato, disminuye en tejidos de camarones infectados con el WSSV y con HIF-1 α silenciado (Datos no publicados). Por lo tanto, nuestros resultados, en conjunto con los obtenidos en el grupo de trabajo, sugieren que el efecto Warburg, inducido por el WSSV, es mediado por la activación de la expresión de genes glucolíticos vía HIF-1.

Mortalidad acumulada de camarones

La mortalidad de los camarones inyectados con el WSSV aumentó 60 y 100 veces a las 48 y 72 horas post-inyección, respectivamente, en comparación al grupo control (Figura 8). En contraste, la mortalidad de los camarones inyectados con el WSSV+dsRNA disminuyó 6.6 y 5 veces a las 48 y 72 horas post-inyección, respectivamente en comparación al grupo WSSV a las 72 horas. Por otro lado, se observó que los camarones inyectados con el WSSV presentaban letargia, anorexia, decoloración rojiza y manchas blancas, mientras que los camarones que fueron inyectados con WSSV+dsRNA se mostraron con movimientos ágiles, apetito normal, sin decoloración y con ausencia de manchas blancas.

Nuestros resultados coinciden con estudios previos en donde el silenciamiento de genes propios del camarón disminuyen la carga viral del WSSV (Liu y col., 2016; Ma y col., 2014; Ongvarrasopone y col., 2008; Soñanez-Organis y col., 2010; Zhang y col., 2014). Lo anterior, no solo demuestra la eficiencia del dsRNA para inducir el mecanismo de RNAi en camarones, si no la importancia que juegan las proteínas silenciadas en el proceso de replicación del virus.

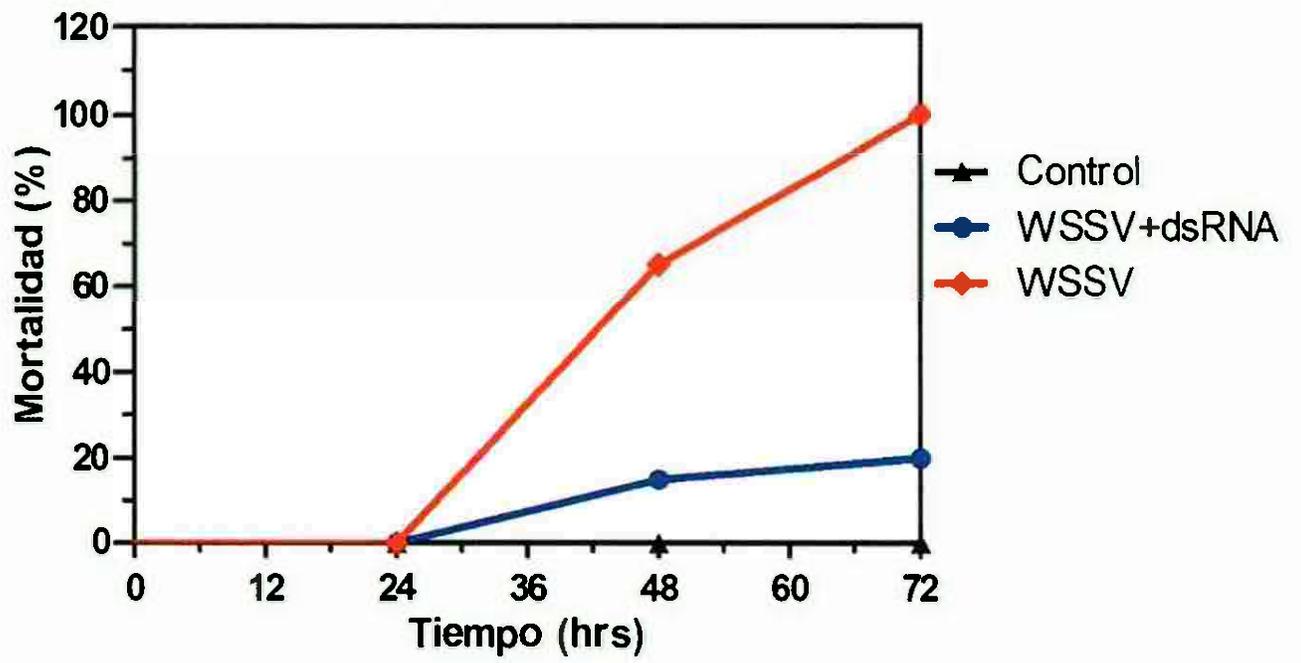


Figura 8. Mortalidad acumulada de camarones infectados con el WSSV.

CONCLUSIÓN

El silenciamiento de HIF-1 α demostró que la carga viral del WSSV disminuye en músculo de camarones infectados, así como su mortalidad. Por lo anterior, nuestros resultados demuestran que HIF-1 es esencial para la replicación del WSSV en camarones infectados. Además, sugieren que el efecto Warburg inducido por el WSSV es regulado por HIF-1.

BIBLIOGRAFIA

- Aigner A. 2006. Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: strategies based on the direct application of siRNAs. *J Biotechnol*, 124(1), 12-25.
- Aoki T, Wang HC, Unajak S, Santos MD, Kondo H, Hirono I. 2011. Microarray analyses of shrimp immune responses. *Mar Biotechnol (NY)*, 13(4), 629-638.
- Attasart P, Kaewkhaw R, Chimwai C, Kongphom U, Namramoon O, Panyim S. 2009. Inhibition of white spot syndrome virus replication in *Penaeus monodon* by combined silencing of viral rr2 and shrimp PmRab7. *Virus Res*, 145(1), 127-133.
- Cai X, Huang Y, Zhang X, Wang S, Zou Z, Wang G, Wang Y, Zhang Z. 2014. Cloning, characterization, hypoxia and heat shock response of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) from the small abalone *Haliotis diversicolor*. *Gene*, 534(2), 256-264.
- Chen, Aoki T, Huang YT, Hirono I, Chen TC, Huang JY, Chang GD, Lo CF, Wang HC. 2011. White spot syndrome virus induces metabolic changes resembling the warburg effect in shrimp hemocytes in the early stage of infection. *J Virol*, 85(24), 12919-12928.
- Chen, Lee DY, Huang YT, Kou GH, Wang HC, Chang GD, Lo CF. 2016. Six Hours after Infection, the Metabolic Changes Induced by WSSV Neutralize the Host's Oxidative Stress Defenses. *Sci Rep*, 6, 27732.
- Chen, Leu JH, Huang CJ, Chou CM, Chen SM, Wang CH, Lo CF, Kou GH. 2002. Identification of a nucleocapsid protein (VP35) gene of shrimp white spot syndrome virus and characterization of the motif important for targeting VP35 to the nuclei of transfected insect cells. *Virology*, 293(1), 44-53.
- Escobedo-Bonilla CM, Alday-Sanz V, Wille M, Sorgeloos P, Pensaert MB, Nauwynck HJ. 2008. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *Journal of Fish Diseases*, 31(1), 1-18.
- Fedele AO, Whitelaw ML, Peet DJ. 2002. Regulation of gene expression by the hypoxia-inducible factors. *Mol Interv*, 2(4), 229-243.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811.
- Hardy KM, Follett CR, Burnett LE, Lema SC. 2012. Gene transcripts encoding hypoxia-inducible factor (HIF) exhibit tissue- and muscle fiber type-dependent responses to hypoxia and hypercapnic hypoxia in the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 163(1), 137-146.

- He NH, Qin QW, Xu X. 2005. Differential profile of genes expressed in hemocytes of White Spot Syndrome Virus-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by combining suppression subtractive hybridization and differential hybridization. *Antiviral Research*, 66(1), 39-45.
- Kono T, Sonoda K, Kitao Y, Mekata T, Itami T, Sakai M. 2009. The Expression Analysis of Innate Immune-related Genes in Kuruma Shrimp *Penaeus japonicus* after DNA Vaccination against Penaeid Rod-shaped DNA Virus. *Fish Pathology*, 44(2), 94-97.
- Leung RK, Whittaker PA. 2005. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacol Ther*, 107(2), 222-239.
- Li DF, Zhang MC, Yang HJ, Zhu YB, Xu X. 2007. Beta-integrin mediates WSSV infection. *Virology*, 368(1), 122-132.
- Little TJ, Hultmark D, Read AF. 2005. Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology. *Nat Immunol*, 6(7), 651-654.
- Liu WJ, Li YC, Kou GH, Lo CF. 2016. Laminin Receptor in Shrimp Is a Cellular Attachment Receptor for White Spot Syndrome Virus. *PLoS One*, 11(6), e0156375.
- Ma FF, Chou ZG, Liu QH, Guan G, Li C, Huang J. 2014. White spot syndrome virus VP12 interacts with adenine nucleotide translocase of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 118, 28-33.
- Mathew S, Nair AKK, Anandan R, Nair PGNV, Devadasan K. 2007. Biochemical studies on changes associated with enzymes of glucose metabolism in white spot syndrome virus (WSSV) infected with *Penaeus monodon* (Fabricius). *African Journal of Biotechnology*, 6(16), 1944-1948.
- Mendoza-Cano F, Sanchez-Paz A. 2013. Development and validation of a quantitative real-time polymerase chain assay for universal detection of the White Spot Syndrome Virus in marine crustaceans. *Virology*, 10, 186.
- Mottet D, Dumont V, Deccache Y, Demazy C, Ninane N, Raes M, Michiels C. 2003. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α protein level during hypoxic conditions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3 β pathway in HepG2 cells. *J Biol Chem*, 278(33), 31277-31285.
- Ongvarrasopone C, Chanasakulniyom M, Sritunyalucksana K, Panyim S. 2008. Suppression of PmRab7 by dsRNA inhibits WSSV or YHV infection in shrimp. *Mar Biotechnol (NY)*, 10(4), 374-381.
- Piontkivska H, Chung JS, Ivanina AV, Sokolov EP, Techa S, Sokolova IM. 2011. Molecular characterization and mRNA expression of two key enzymes of hypoxia-sensing pathways in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin):

- hypoxia-inducible factor alpha (HIF-alpha) and HIF-prolyl hydroxylase (PHD). *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*, 6(2), 103-114.
- Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. 2006. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*, 441(7092), 437-443.
- Robalino J, Bartlett T, Shepard E, Prior S, Jaramillo G, Scura E, Chapman RW, Gross PS, Browdy CL, Warr GW. 2005. Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response? *J Virol*, 79(21), 13561-13571.
- Rosas C, Martinez E, Gaxiola G, Brito R, Sanchez A, Soto LA. 1999. The effect of dissolved oxygen and salinity on oxygen consumption, ammonia excretion and osmotic pressure of *Penaeus setiferus* (Linnaeus) juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 234(1), 41-57.
- Sagi A, Manor R, Ventura T. 2013. Gene silencing in crustaceans: from basic research to biotechnologies. *Genes (Basel)*, 4(4), 620-645.
- Salzet M. 2001. Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses. *Trends Immunol*, 22(6), 285-288.
- Sanchez-Paz A. 2010. White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. *Vet Res*, 41(6), 43.
- Sarathi M, Simon MC, Ahmed VP, Kumar SR, Hameed AS. 2008. Silencing VP28 gene of white spot syndrome virus of shrimp by bacterially expressed dsRNA. *Mar Biotechnol (NY)*, 10(2), 198-206.
- Semenza GL. 1998. Hypoxia-inducible factor 1 and the molecular physiology of oxygen homeostasis. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 131(3), 207-214.
- Semenza GL. 2000. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol (1985)*, 88(4), 1474-1480.
- Semenza GL. 2001. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol*, 13(2), 167-171.
- Shafee N, Kaluz S, Ru N, Stanbridge EJ. 2009. PI3K/Akt activity has variable cell-specific effects on expression of HIF target genes, CA9 and VEGF, in human cancer cell lines. *Cancer Lett*, 282(1), 109-115.
- Soñanez-Organis JG, Peregrino-Uriarte AB, Gomez-Jimenez S, Lopez-Zavala A, Forman HJ, Yepiz-Plascencia G. 2009. Molecular characterization of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and tissue-specific expression under hypoxia. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 150(3), 395-405.

- Soñanez-Organis JG, Peregrino-Uriarte AB, Sotelo-Mundo RR, Forman HJ, Yepiz-Plascencia G. 2011. Hexokinase from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: cDNA sequence, structural protein model and regulation via HIF-1 in response to hypoxia. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 158(3), 242-249.
- Soñanez-Organis JG, Racotta IS, Yepiz-Plascencia G. 2010. Silencing of the hypoxia inducible factor 1-HIF-1-obliterates the effects of hypoxia on glucose and lactate concentrations in a tissue-specific manner in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 393(1-2), 51-58.
- Soñanez-Organis JG, Rodriguez-Armenta M, Leal-Rubio B, Peregrino-Uriarte AB, Gomez-Jimenez S, Yepiz-Plascencia G. 2012. Alternative splicing generates two lactate dehydrogenase subunits differentially expressed during hypoxia via HIF-1 in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Biochimie*, 94(5), 1250-1260.
- Sritunyalucksana K, Wannapapho W, Lo CF, Flegel TW. 2006. PmRab7 is a VP28-binding protein involved in white spot syndrome virus infection in shrimp. *J Virol*, 80(21), 10734-10742.
- Su MA, Huang YT, Chen IT, Lee DY, Hsieh YC, Li CY, Ng TH, Liang SY, Lin SY, Huang SW, Chiang YA, Yu HT, Khoo KH, Chang GD, Lo CF, Wang HC. 2014. An invertebrate Warburg effect: a shrimp virus achieves successful replication by altering the host metabolome via the PI3K-Akt-mTOR pathway. *PLoS Pathog*, 10(6), e1004196.
- Taylor, Zhulin IB. 1999. PAS domains: Internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(2), 479-+.
- van Hulten MC, Witteveldt J, Peters S, Kloosterboer N, Tarchini R, Fiers M, Sandbrink H, Lankhorst RK, Vlak JM. 2001. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology*, 286(1), 7-22.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029-1033.
- Wang W, Zhang X. 2008. Comparison of antiviral efficiency of immune responses in shrimp. *Fish Shellfish Immunol*, 25(5), 522-527.
- Westenberg M, Heinhuis B, Zuidema D, Vlak JM. 2005. siRNA injection induces sequence-independent protection in *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus. *Virus Res*, 114(1-2), 133-139.
- Wu W, Wang L, Zhang X. 2005. Identification of white spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection. *Virology*, 332(2), 578-583.
- Xu J, Han F, Zhang X. 2007. Silencing shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes by siRNA. *Antiviral Res*, 73(2), 126-131.

- Yang F, He J, Lin X, Li Q, Pan D, Zhang X, Xu X. 2001. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *J Virol*, 75(23), 11811-11820.
- Zhang JY, Liu QH, Huang J. 2014. Multiple proteins of White spot syndrome virus involved in recognition of beta-integrin. *J Biosci*, 39(3), 381-388.
- Zhao ZY, Yin ZX, Weng SP, Guan HJ, Li SD, Xing K, Chan SM, He JG. 2007. Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of white spot syndrome virus-resistant shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by suppression subtractive hybridisation. *Fish Shellfish Immunol*, 22(5), 520-534.
- Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL. 2000. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res*, 60(6), 1541-1545.
- Zinkernagel AS, Johnson RS, Nizet V. 2007. Hypoxia inducible factor (HIF) function in innate immunity and infection. *J Mol Med (Berl)*, 85(12), 1339-1346.