**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional**

**Unidad Mérida**

**Departamento de Recursos del Mar**

# Caracterización molecular y metabólica de los cambios ocurridos en los intestinos y la glándula antenal de la langosta espinosa *Panulirus argus* (Latreille, 1804), durante la infección por el virus PaV1

Tesis que presenta:

**Ioreni Margarita Hernández Velázquez**

Para obtener el grado de:

**Doctor en Ciencias**

En la especialidad de:

**Ciencias Marinas**

Director de la Tesis:

**Dra. Rossanna del Pilar Rodríguez Canul**

**Dra. Patricia Dolores Briones Fourzán**

Mérida, Yucatán Abril de 2023

## Tabla de contenido


RESUMEN....3

ABSTRACT....4

DEDICATORIA....5

AGRADECIMIENTOS....6

INTRODUCCIÓN GENERAL....6

**CAPÍTULO 1. EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS TRANSCRIPTÓMICOS INDUCIDOS POR EL VIRUS PAV1 EN LOS INTESTINOS DE LA LANGOSTA ESPINOSA DEL CARIBE, *PANULIRUS ARGUS* (LATREILLE, 1804) (DECAPODA: ACHELATA: PALINURIDAE)**....12

1.1. Introducción....12

1.2. Hipótesis y Objetivo....13

1.2.1. Hipótesis....13

1.2.2. Objetivo....13

1.3. Materiales y métodos....13

1.3.1. Muestreo de langostas....13

1.3.2. Cuantificación de carga viral y separación en grupos....14

1.3.3. Preparación de las librerías de cDNA para los análisis transcriptómicos....15

1.3.4. Análisis de calidad de los datos de secuenciación masiva....15

1.3.5. Ensamble *de novo* y análisis de expresión diferencial....16

1.3.6. Anotación del transcriptoma....16

1.3.7. Validación de resultados por RT-qPCR....17

1.4. Resultados....18

1.4.1. Características de las muestras y resultado de la cuantificación de la carga viral....18

1.4.2. Análisis del transcriptoma....19

1.4.3. Análisis de rutas metabólicas....21

1.4.4. Validación de datos transcriptómicos mediante RT-qPCR....28

1.5. Discusión....28

1.5.1 Alteración de la maquinaria de regulación transcripcional....29

1.5.2. Cambios inducidos por el PaV1 en procesos transcripcionales, proteínas citoesqueléticas y la homeostasis del hierro....31

1.5.3. Desregulación de las rutas de señalización celular y procesos de transporte membranal....34

1.5.4. Regulación de las proteasas digestivas....36

1.6. Conclusión....36

**CAPÍTULO 2: ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS CAMBIOS METABÓLICOS QUE OCURREN EN LAS GLÁNDULAS ANTENALES DE LA LANGOSTA ESPINOSA DEL CARIBE, *PANULIRUS ARGUS* (LATREILLE, 1804), INFECTADA CON EL PANULIRUS ARGUS VIRUS 1**....38

2.1. Introducción....38

2.2 Hipótesis y objetivo....40

2.2.1. Hipótesis....40

2.2.2 Objetivos....40

2.3. Materiales y métodos....40

2.3.1. Captura de langostas ..... 40
2.3.2. Recolección de muestras ..... 41
2.3.3. Cuantificación viral por qPCR ..... 41
2.3.4. Extracción de metabolitos ..... 42
2.3.5. Adquisición de espectros $^{1}$H-NMR y procesamiento ..... 42
2.3.6. Identificación de metabolitos y análisis multivariado ..... 42
2.4. Resultados ..... 43
2.4.1. *P. argus* clínicamente infectados y no infectados ..... 43
2.4.2. Diferencias en los metabolitos entre grupos experimentales ..... 44
2.4.3. Diferencias en los metabolitos entre sexos ..... 47
2.5. Discusión ..... 48
2.6. Conclusión ..... 53
**CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN GENERALES** ..... 55
3.1. Discusión general ..... 55
3.1.1. Desregulación de la expresión génica y su efecto en el metabolismo ..... 55
3.1.2. Transporte de iones y osmorregulación: funciones compartidas ..... 56
3.1.3. Sistema inmune y replicación viral ..... 57
3.2. Conclusión General ..... 58
3.3. Perspectivas ..... 59
**BIBLIOGRAFÍA** ..... 60

## Lista de Figuras

Figura 1. Estadísticas generales de calidad para las librerías generadas para cada condición experimental. 20

Figura 2. Estadísticas generales para los datos de cada condición experimental generadas en el análisis de expresión diferencial. 21

Figura 3. Gráfico Upset plot mostrando las bases de datos usadas durante el proceso de anotación y los ... 22

transcritos compartidos entre ellas. 22

Figura 4. Gráfico de árbol de las anotaciones GO de los transcritos sobre-expresados y sub-expresados en el transcriptoma. 23

Figura 5. Análisis de enriquecimiento funcional para las categorías ontológicas anotadas para los transcritos alterados. 24

Figura 6. Transcritos diferenciales (DEG) mapeados contra la base de datos KEGG. La mayoría de los DEG codifican para enzimas. 25

Figura 7. Términos de Rutas de Señalización como PI3K-Akt, cGMP-PKG, MAPK, mTOR, cAMP y AMPK poseen elementos alterados. 26

Figura 8. Identificación de los DEGs en los componentes del spliceosoma de P. argus infectado con PaV1. 27

Figura 9. Prueba de Spearman mostrando una correlación entre los patrones de expresión obtenidos por .. 28

RNAseq y por RT-qPCR. 28

Figura 10. Perfil metabólico del extracto acuoso de la glándula antenal de Panulirus argus. El gráfico OPLS fue analizado con base en A) la carga viral (NIL vs CIL) y B) el sexo de las langostas. 46

Figura 11. Espectro 1H-NMR de los compuestos diferenciales comparando los grupos CIL (Clinically infected lobsters) vs NIL (Non-clinically infected lobsters) de P. argus. 47

## Lista de Cuadros

Cuadro 1. Genes sobre-expresados y sub-expresados utilizados para validar los datos obtenidos por RNA-Seq 18

Cuadro 2. Estadísticas generales del ensamble *de novo* 19

Cuadro 3. Lista de compuestos identificados por H1-NMR. 44

Cuadro 4. Metabolitos alterados identificados en la comparación de los grupos CIL y NIL. 45

GLOSARIO

**Biofluido:** fluido que circula dentro de un organismo vivo o es excretado por el mismo. Son biofluidos las lágrimas, saliva, sangre, hemolinfa, savia, exudados vegetales, sudor, orina y heces.

**Biomarcadores:** molécula biológica que se encuentra en algún tejido del cuerpo y cuya presencia es un signo de un proceso normal, estable o inicial en relación a un proceso de respuesta a una enfermedad, a un tratamiento experimental, a una condición ambiental, etc. Es un indicador de estado biológico.

**Disbiosis:** es el desbalance del equilibrio microbiano de la microbiota normal, ya sea por cambios cuantitativos o cualitativos de su composición, cambios en su funcionamiento, o bien por cambios en su estructura.

**Feromona:** son sustancias químicas que producen y secretan los seres vivos y son capaces de modificar el comportamiento del individuo que las percibe y desencadenando una respuesta social.

**Gregario:** que vive dentro de un grupo o comunidad. Los animales gregarios viven en manadas o rebaños o cualquier otro tipo de grupo.

**Metabolito:** es cualquier molécula producida durante el metabolismo.

**Perfil metabolómico:** huellas de metabolitos únicos que dejan los procesos celulares específicos.

**Regulación postraduccional:** es el control del procesamiento del ARN posterior a la transcripción. Este proceso regula la estabilidad y distribución de la molécula de ARN por medio de eventos como el empalme alternativo, la degradación nuclear, la exportación nuclear, almacenamiento, etc.

**Signos clínicos:** manifestación observable y comprobable de una enfermedad durante la examinación física, mediante la inspección que realiza el profesional evaluador.

**Transcripción:** proceso por el cual una célula elabora una copia de ARN a partir de una secuencia de ADN. Esta copia de ARN, que se llama ARN mensajero (ARNm), transporta la información genética que se necesita para elaborar las proteínas en una célula.

**Transcrito:** molécula de ARN monocatenario que se obtiene inmediatamente después de la transcripción (transcrito primario).

**Virus:** partículas microscópicas infecciosas con un material genético que se encuentra rodeado de una envoltura proteica que solo se replica dentro de las células vivas de un organismo.

RESUMEN

Panulirus argus virus 1, es un virus que afecta de forma natural y exclusiva a la langosta espinosa del Caribe, *Panulirus argus*. Este virus ataca preferentemente sus estadios juveniles y les causa la muerte por fallo metabólico masivo. El intestino constituye un sitio de entrada para el virus, sobre todo cuando las langostas consumen material infectado. La infección se propaga rápidamente y causa disbiosis en este órgano. Otra de las características de la infección viral es que las langostas pierden su capacidad gregaria y su instinto de escape, mientras que las langostas sanas tienden a evitar a las langostas infectadas. Este comportamiento aún no tiene explicación, pero se piensa que es consecuencia de las feromonas presentes en biofluidos como la orina expulsada por la glándula antenal en langostas infectadas. En este trabajo, se caracterizaron los cambios transcriptómicos en intestinos de langostas enfermas y las alteraciones metabolómicas en la glándula antenal. Se realizaron evaluaciones transcriptómicas sobre los intestinos de langostas infectadas con PaV1 mediante secuenciación por RNA-Seq. Se identificaron 3,405 transcritos diferenciales no redundantes (1,920 sobre-expresados y 1,485 sub-expresados) en respuesta a la infección. Se encontraron alteraciones principalmente en la regulación transcripcional, splicing, regulación postraduccional, señalización de proteínas, transporte transmembranal, regulación citoesquelética y proteólisis. Posteriormente, se realizó una comparación de los perfiles metabólicos de las glándulas antenales de langostas infectadas y langostas sin signos clínicos del PaV1. Mediante resonancia magnética nuclear de protón (1H-NMR, por sus siglas en inglés) se identificaron 48 compuestos relacionados con el metabolismo energético, de carbohidratos, aminoácidos y nucleótidos. La mayoría de los metabolitos disminuyeron en las langostas infectadas, principalmente aminoácidos esenciales y no esenciales. Esta es la primera investigación sobre la regulación transcriptómica y metabolómica en la interacción PaV1-*P. argus*. La información generada contribuye a conocer los mecanismos moleculares que intervienen en el intestino y la glándula antenal durante la infección por PaV1 para poder tratar adecuadamente esta enfermedad en *Panulirus argus*.

ABSTRACT

The Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus*, is currently threatened by the presence of pathogenic Panulirus argus virus 1, which naturally and exclusively affects this species and is most lethal in juvenile lobsters. The virus affects the immune system and other organs in lobsters, which causes massive metabolic failure and death. When lobsters engage in cannibalism and eat infected tissues, the intestine serves as a point of entry for the virus. Additionally, the virus spreads quickly and results in severe dysbiosis in the lobster's gut. Furthermore, while healthy lobsters are able to recognize and avoid infected lobsters, diseased lobsters lose their gregariousness and avoidance behavior. This behavior has not been explained, but it is thought to be caused by pheromones in biofluids such as urine secreted by infected lobster antennal glands. The present study characterized the metabolomic alterations occurred in antennal glands and the transcriptional changes in the intestines of diseased lobsters. RNA-Seq analysis produced 3,405 non redundant differential transcripts, 1,920 of which were up-regulated and 1,485 of which were down-regulated, were found. Transcripts involved in protein signaling, transmembrane transport, cytoskeletal regulation, transcriptional regulation, splicing, post-transcriptional regulation, and proteolysis all had changes. The metabolic profile of the antennal gland of lobsters with and without clinical signs of PaV1 infection was later determined using proton nuclear magnetic resonance (1H-NMR) analysis. There were 48 substances found to be involved in the metabolism of amino acids, carbohydrates, energy, and nucleotides. Essential and non-essential amino acids made up the majority of the down-regulated metabolites in the infected group. This research represents a pioneering effort into the transcriptomic and metabolic analysis of the PaV1-*P. argus* interaction. The information produced can aid in understanding the molecular processes occurring during PaV1 infection in the intestine and antennal gland.

DEDICATORIA

Mi tesis se la dedico a mi amigo, novio y esposo Alejandro Zamora, por su apoyo tanto en lo técnico como en lo sentimental, por creer en mí y darme ánimos aún en los momentos más oscuros y por ser la fuente de motivación e inspiración del proyecto que decidimos emprender juntos: nuestro proyecto de vida.

A mis niños Rafael y Alejandrito que con sus risas, abrazos y locuras dan luz a mi vida y me enseñan el valor de la inocencia de un niño.

A mis padres y hermanas quienes sentaron las bases de la mujer que soy hoy y quienes siempre tuvieron un consejo que ofrecerme ante las adversidades.

A todas las personas a mi alrededor que me comprendieron y apoyaron durante estos años para hacer este proyecto posible.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV IPN) y al Programa de Posgrado de Recursos del Mar por todo el apoyo brindado.

Quiero agradecer a la Dra. Rossanna Rodríguez por todo el respaldo académico y personal que me ha brindado durante todo este tiempo.

Agradezco a la Dra. Patricia Briones Fourzán por todo el apoyo académico recibido durante todo este tiempo.

Agradezco a mi comité de tesis conformado por el Dr. Enrique Lozano, el Dr. Rafael Rivera Bustamante y la Dra. Reyna Collí Dulá, por sus comentarios para mejorar esta tesis.

Agradezco también a los integrantes del laboratorio de Crustáceos de la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales (UASA), Puerto Morelos, del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM así como a los integrantes del laboratorio de inmunología y Biología molecular por todas las facilidades logísticas y técnicas que me brindaron, en particular al M. en C. Fernando Negrete Soto (UNAM) y a la M. en C. Cecilia Barradas Ortiz (UNAM), el M. en C. Juan Antonio Pérez-Vega (CINVESTAV), la Biol. Irma Coyolxauhqui Pérez (CINVESTAV) y el Ing. Richard Juan de Dios Mena Loria (CINVESTAV).

# INTRODUCCIÓN GENERAL

La langosta espinosa del Caribe, *Panulirus argus* (Latreille, 1804), es un organismo marino que pertenece a una de las aproximadamente 52 000 especies que conforman al grupo de los crustáceos (Land, 1996). Los crustáceos exhiben una gran variedad morfológica, pero tienen en común un cuerpo con una cabeza con cinco segmentos y un tronco postcefálico divido en tórax y abdomen, un caparazón, apéndices y mandíbulas multiarticuladas, sistema excretor nefridial, sistema digestivo con ciegos gástricos y presencia de una larva nauplio con ojos fusionados (Álvarez *et al*., 2014). En particular, las langostas espinosas del Caribe poseen un cuerpo alargado con un color verdoso o café, caparazón cubierto de espinas y puntos amarillos en el abdomen. Además, poseen un par de "cuernos" dirigidos hacia adelante sobre sus pedúnculos oculares ubicados en el área cefálica. Sus dos antenas son gruesas y están cubiertas de espinas mientras su par de anténulas, ubicadas entre cada una de las antenas, son delgadas y poseen filamentos birrámeos en el área distal. Los filamentos laterales poseen estructuras microscópicas (*i.e*., estetascos) que constituyen las principales estructuras olfativas de esta especie (Laverack, 1964; Saul, 2004).

La historia de vida de *P. argus* es compleja e incluye cuatro fases fundamentales de desarrollo: larval (filosoma), puérulo, juvenil y adulto. La fase larval se desarrolla en el océano mientras que en la fase de puérulo se incrementan las habilidades de nado, por lo que durante esta fase las langostas tienden a moverse hacia aguas poco profundas y cercanas a la costa para asentarse en el fondo, donde siguen creciendo y desarrollándose en hábitats que generalmente comprenden cúmulos de algas, raíces de manglares, pastizales y esponjas marinas (Marx y Herrnkind, 1985). *P. argus* alcanza la madurez sexual al llegar a una medida aproximada de 80 mm de longitud cefalotorácica (CL) (Atherley *et al*., 2021). Cuando llegan a la etapa de adulto, las langostas son totalmente bentónicas y a diferencia de las etapas más tempranas de desarrollo, son altamente sociables, pues suelen buscar la compañía de otras langostas en refugios angostos con el fin de defenderse de depredadores.

La distribución geográfica de *P. argus* comprende desde las costas de Carolina del Norte en los Estados Unidos, hasta la región del Gran Caribe y parte de América del Sur (Moss *et al*.,

2013; Shields y Behringer, 2004). Por otra parte, esta especie representa un elemento de enorme valor económico. Por ejemplo, en 2020 se reportaron capturas por más de 24 000 toneladas, equivalentes a ganancias aproximadas de 42 millones de dólares (NOAA, 2022).

Desde hace algunos años, las poblaciones de *P. argus* se enfrentan a diferentes factores que amenazan su estabilidad, entre los que se incluyen la pesca excesiva, la destrucción de su hábitat o la dispersión de enfermedades (Cochrane y Chakalall, 2001). En este sentido, *P. argus* es susceptible de contraer diversas enfermedades (Atherley *et al*., 2020), pero la enfermedad producida por el *Panulirus argus* virus 1 (PaV1) es la principal, pues además de ser el primer y único virus reportado capaz de infectar de manera natural a esta especie, es un virus mortal que afecta principalmente a las etapas juveniles de desarrollo (Shields y Behringer, 2004).

El PaV1 fue descubierto en el año 2000 en los Cayos, Florida en los Estados Unidos. Desde entonces, el virus ha generado alarma, debido a sus altas prevalencia y tasa de mortalidad, especialmente en langostas en estado juvenil (Butler *et al*., 2008; Candia-Zulbarán *et al*., 2012; Huchin-Mian *et al*., 2009a; Shields y Behringer, 2004). Esta enfermedad presenta un fuerte componente ontogenético, afectando mayormente a las langostas en estado juvenil (7-45 mm de LC), lo que se ve reflejado en el hecho de que las mayores prevalencias y mortalidades (60-100%) ocurren en juveniles tempranos (5-15 mm LC) (Lozano-Álvarez *et al*., 2008 y dichas prevalencias disminuyen rápidamente al incrementar la etapa de desarrollo (Shields y Behringer, 2004). Es importante mencionar que la evaluación de las prevalencias del PaV1 varía espacial y temporalmente de forma natural. Además, dichos parámetros varían de acuerdo a las técnicas empleadas para el diagnóstico de la infección. Por ejemplo, algunos de los métodos para estimar la prevalencia de PaV1 incluyen el uso de técnicas microscópicas, moleculares o simple diagnóstico visual de los signos clínicos de la infección. Como es de esperarse, cada método ofrece sus ventajas y sus desventajas y varían en términos de sensibilidad, costo y especificidad (Butler *et al.*, 2015; Davies *et al*., 2020; Li *et al*., 2006; Lozano-Álvarez *et al*., 2008).

El PaV1 es un virus no ocluido, de forma icosahédrica, con una nucleocápside de aproximadamente 182 ± 9 nm y cuyo material genético está compuesto por DNA de doble

cadena (Li *et al*., 2008; Li y Shields, 2007; Behringer *et al*., 2011). Debido a sus características, anteriormente el PaV1 estaba considerado como un virus de morfología similar a la de la familia iridoviridae, pero recientemente un análisis genómico reubicó a este virus dentro de una nueva familia viral, la familia Mininucleoviridae (Subramaniam *et al*., 2020).

El sitio primario de infección ocasionada por el PaV1 se encuentra en los hemocitos hialinos y semigranulares y en los fagocitos fijos del hepatopáncreas (Li *et al*., 2008; Shields y Behringer, 2004). Posteriormente, la infección se propaga a nivel sistémico y termina por afectar todos sus órganos (Li *et al*., 2008). Las langostas crónicamente infectadas con este virus desarrollan una serie de signos clínicos típicos que incluyen la aparición de una coloración rojiza en su exoesqueleto, una hemolinfa de apariencia lechosa y la incapacidad de mudar. Los individuos afectados también presentan letargia y anorexia, mientras que las langostas sanas, que muestran un comportamiento típicamente gregario, tienden a evitar los refugios en los que se encuentren langostas infectadas (Behringer *et al*., 2008, 2011; Li *et al*., 2006).

Debido a la destrucción paulatina de las células infectadas, PaV1 también es capaz de causar afectaciones no visibles como la disminución significativa en el conteo total de hemocitos y en la concentración de glucosa y el incremento de los niveles de fósforo y triglicéridos (Li *et al*., 2008; Pascual-Jiménez et al., 2012; Herrera-Salvatierra et al., 2018). PaV1 también trae como consecuencia una disminución en las reservas de glicógeno, así como la pérdida de capacidades digestivas y alteraciones en la microbiota intestinal (Zamora-Briseño *et al*., 2020). Las afectaciones sobre el sistema digestivo y en particular sobre el intestino son importantes debido a que en él se desarrollan funciones de digestión, ósmosis, mantenimiento del sistema inmune y desarrollo de neurotransmisores, entre otros (Charmantier, 1998; Ooi *et al*., 2017; Zamora-Briseño *et al*., 2020).

Las enfermedades bacterianas, fúngicas y en particular las virales, son capaces de generar cambios a nivel molecular en sus hospederos (Sheweita y Alsamgham, 2020). De igual manera, la desnutrición y las alteraciones a nivel de la microbiota intestinal a la que se ven sometidas las langostas durante el desarrollo de la enfermedad por PaV1, también puede

provocar alteraciones en los procesos moleculares de los órganos afectados (Jawahar *et al*., 2022). A pesar de estas consideraciones, se sabe relativamente poco sobre los cambios provocados por el PaV1 a nivel molecular en un sistema tan importante para el mantenimiento del estado de salud general de esta especie como lo es el tracto intestinal.

Las enfermedades virales también tienen como consecuencia desórdenes metabólicos en el huésped (Wang, 2014; Kvansakul, 2017; Liu *et al*., 2019). Tal es la importancia de estos desequilibrios metabólicos que los perfiles metabolómicos han sido utilizados para identificar biomarcadores de enfermedades y para el desarrollo de terapias clínicas (Wang *et al*., 2013b). Además, los perfiles metabólicos son útiles para describir los cambios bioquímicos y de comportamientos que ocurren durante el desarrollo de una infección (Sanchez y Lagunoff, 2015; Oromi *et al*., 2017; Liu *et al*., 2019; Humer *et al*., 2020). Por ejemplo, durante la infección por PaV1, las langostas sanas evitan a las langostas enfermas (Behringer *et al*., 2008, 2011; Li *et al*., 2006) y dicho fenómeno probablemente es mediado por feromonas o señales químicas que son capaces de modificar el comportamiento intra e interespecífico de los organismos (Savic *et al*., 2009; Wyatt, 2009; Yao *et al*., 2009; Behringer y Butler, 2010; Berry y Breithaupt, 2010; Bauer, 2011; Candia-Zulbarán *et al*., 2015).

Las feromonas se liberan al ambiente a través de fluidos corporales que incluyen la orina, la hemolinfa, las heces, etc. (Yao *et al*., 2009). Como otros animales marinos, las langostas emiten señales químicas principalmente a través de la orina y las moléculas de los metabolitos presentes en esa orina son identificados por sus conespecíficos, modulando diversos aspectos de comportamiento tales como la elección de refugios adecuados o la búsqueda de pareja, aunque también pueden ser usadas como señales de peligro o advertencia (Li *et al*., 2008; Yao *et al*., 2009). Sin embargo, estas señales químicas dependen de la fisiología del organismo que las emite y de los cambios en el ambiente en que se desarrolla (Ross y Behringer, 2019). Por tanto, una enfermedad como la causada por el PaV1 podría cambiar el estatus metabólico de los individuos infectados.

En *P. argus*, la orina, que se libera a través de las glándulas antenales, es la fuente principal de feromonas (Freire *et al*., 2008; Aggio y Derby, 2011; Tsai y Lin, 2014). Los crustáceos

poseen dos glándulas antenales que se encuentran en la cavidad cefálica, en la porción suborbital de los tallos oculares (Tsai y Lin, 2014; Atherley *et al*., 2020). Las glándulas antenales son conocidas por poseer funciones análogas a las de los riñones de los vertebrados, es decir, funciones de excreción de desechos metabólicos (*e.g.*, $Mg^{2}$ y $SO_4^{2-}$ y productos nitrogenados) y osmorreguladoras (Malley, 1977; Tsai y Lin, 2014). A pesar de la importante función de este órgano, se desconocen los cambios a nivel molecular y metabolómico ocurridos durante la infección por PaV1 o si estos cambios son capaces de influir en las interacciones sociales y los cambios de comportamiento previamente descritos como consecuencia de los procesos bioquímicos alterados durante la infección.

El presente trabajo tuvo como finalidad generar conocimiento para ayudar a esclarecer las razones del desbalance metabólico y alteraciones del comportamiento mencionadas en los párrafos anteriores. En los siguientes capítulos se presentan los resultados de los análisis transcriptómico y metabolómico comparativos del intestino y la glándula antenal respectivamente, de juveniles de *P. argus* con y sin signos clínicos de PaV1.

# CAPÍTULO 1. EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS TRANSCRIPTÓMICOS INDUCIDOS POR EL VIRUS PAV1 EN LOS INTESTINOS DE LA LANGOSTA ESPINOSA DEL CARIBE, *PANULIRUS ARGUS* (LATREILLE, 1804) (DECAPODA: ACHELATA: PALINURIDAE)

## 1.1. Introducción

La infección crónica, degenerativa y potencialmente letal producida por PaV1 causa efectos importantes sobre su hospedero a nivel fisiológico y nutricional, así como sobre el sistema inmune, lo que en parte se refleja a través de los signos clínicos característicos de la enfermedad. En este sentido, algunos de los cambios documentados que ocurren en los individuos infectados incluyen la disminución en el número de hemocitos totales y en las reservas energéticas, así como la pérdida de capacidades digestivas (Pascual-Jiménez *et al*., 2012; Herrera-Salvatierra *et al*., 2019).

En las etapas tardías del proceso infeccioso, el PaV1 se propaga por todos los órganos de las langostas y uno de los sistemas más afectado es el sistema digestivo, particularmente el hepatopáncreas y el intestino. Por ejemplo, en langostas enfermas se ha reportado una importante reducción en la actividad de tripsina y quimiotripsina, dos enzimas digestivas clave para el funcionamiento del hepatopáncreas (Herrera-Salvatierra *et al*., 2019; Zamora-Briseño *et al*., 2020a) y que están involucradas en diversos procesos bioquímicos que incluyen la digestión de proteínas, funciones de coagulación y funciones clave en los procesos inmunológicos (Perera *et al*., 2008).

Además de sus funciones canónicas, el intestino también juega un papel clave en la resistencia a enfermedades, en el metabolismo energético, el mantenimiento de la homeóstasis, la absorción de nutrientes, el establecimiento de microbiota intestinal, la producción de neurotransmisores y la regulación del flujo sanguíneo, por lo que un daño severo en este órgano puede poner en riesgo múltiples procesos biológicos clave (O'Mahony *et al*., 2015; Du *et al*., 2016; Mittal *et al*., 2017; Pickard *et al*., 2017; Liu *et al*., 2019). Además, recientemente se reportó que el PaV1 es capaz de generar una disbiosis

en la microbiota intestinal, lo que también puede afectar las funciones biológicas asociadas a dicha microbiota (Zamora-Briseño *et al*., 2020b). A pesar de estas consideraciones, no existe información sobre los cambios moleculares ocurridos en el intestino de *P. argus* durante la infección clínica provocada por PaV1.

En este capítulo se analizaron las alteraciones transcriptómicas ocurridas en langostas juveniles infectadas con PaV1 con el objetivo de proveer información sobre los mecanismos transcripcionales afectados en este órgano bajo condiciones de infección por PaV1.

## 1.2. Hipótesis y Objetivo

### 1.2.1. Hipótesis

Se observarán alteraciones en el intestino a nivel transcripcional en langostas con signos clínicos asociadas al virus PaV1 en comparación con langostas que no presenten los signos clínicos.

### 1.2.2. Objetivo

Caracterizar los perfiles de transcripción en el intestino de *Panulirus argus* en respuesta a la infección por PaV1.

## 1.3. Materiales y métodos

### 1.3.1. Muestreo de langostas

Se realizó un muestreo de langostas vivas en etapa juvenil (15-40 mm LC) en la Laguna Arrecifal de Puerto Morelos, Quintana Roo, México (20°51′N, 86°52′W), en noviembre de 2018 (con el permiso de colecta No. PPF/DGOPA-259/14 emitido por la Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca). Las langostas colectadas fueron evaluadas visualmente en busca de signos clínicos de la infección por PaV1 (*e.g.*, hemolinfa lechosa y coloración rojiza del exoesqueleto y/o presencia abundante de epibiontes).

Las langostas se mantuvieron en condiciones de aireación para ser sexadas y sólo se seleccionaron aquellas que no presentaron heridas aparentes y que estuvieron en fase de intermuda. Las langostas elegidas bajo este criterio fueron anestesiadas sumergiéndolas en agua fría (~4°C) por al menos 5 minutos y posteriormente fueron disectadas de forma aséptica para extraer la porción del intestino comprendido entre el final del estómago pilórico y el ano. Las muestras de intestino se fijaron en cinco volúmenes de RNA later (Ambion©), se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

1.3.2. Cuantificación de carga viral y separación en grupos

A partir del seno pericárdico, de cada langosta se colectó un volumen equivalente a un mililitro de hemolinfa. Para ello, se usaron jeringas estériles que contenían dos volúmenes de solución anticoagulante (NaCl 450 mM, KCl 10 mM, HEPES 10 mM, EDTA 10 mM, pH 7.0; Vargas-Albores *et al*., 1993) previamente enfriada a 4°C. Posteriormente, la hemolinfa se centrifugó por cinco minutos a 2 500 x *g* y 4°C. El sobrenadante se descartó y cada pastilla resultante (*i.e.*, hemocitos) se fijó en cuatro volúmenes de DNA/RNA shield (Zymo Research©), para posteriormente hacer la extracción de gDNA.

El gDNA se extrajo y purificó usando el paquete comercial de extracción de DNA Quick-DNA™ Universal Kit (Zymo Research©). La integridad del gDNA se evaluó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Luego, se realizó la cuantificación de la carga viral por medio de PCR cuantitativa (qPCR), siguiendo el método previamente establecido por Clark *et al*. (2018) con modificaciones menores. En resumen, lo que se hizo fue obtener un amplicón de 499 pb del genoma del PaV1, el cual se generó mediante el protocolo de PCR establecido por Montgomery-Fullerton *et al*. (2007). Dicho fragmento se clonó usando el paquete comercial de clonación CloneJET PCR Cloning Kit™ (Thermo Scientific©). Los insertos se secuenciaron y los plásmidos recombinantes fueron usados como plantilla para la cuantificación de la carga viral usando una curva estándar. Para la construcción de la curva estándar, se realizaron diluciones seriadas (1:5) del plásmido recombinante equivalente a un rango dinámico de entre 30 y $3x10^9$ copias virales. Las qPCRs se llevaron a cabo en un equipo Rotor Gene® real-time PCR thermocycler en un volumen final de 10 µL compuesto por 5 µL de QuantiNova Probe PCR (QIAGEN©), 0.15 µM de cada primer, 0.3 µL

de 20X PaV1-TaqMan y 2 µL de la dilución del plásmido o 2 µL de gDNA de cada muestra (equivalente a 65-140 ng). Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: un paso de 10 minutos a 95°C de desnaturalización inicial, seguido de 40 ciclos de amplificación, cada uno compuesto de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 62°C. Las muestras fueron separadas en los grupos de estudio basados en el resultado de la cuantificación viral. Con base en lo anterior, se consideraron dos grupos de contraste: el grupo de las langostas clínicamente infectadas (CIL), con cargas virales mayores a $1x10^6$ copias virales·$ng^{-1}$ de gDNA y el grupo de las langostas subclínicamente infectadas (NIL), con cargas virales menores a $1x10^3$ copias virales·$ng^{-1}$ de gDNA y sin signos clínicos de infección.

### 1.3.3. Preparación de las librerías de cDNA para los análisis transcriptómicos

Para realizar los análisis transcriptómicos, se seleccionaron cinco muestras de intestino de ambos grupos de contraste. A dichas muestras se les extrajo el RNA total usando el TRIzol Reagent® (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific©). Las concentraciones de RNA fueron determinadas usando un equipo Qubit 2.0 fluorometer (Life Technologies©), mientras que la integridad de los RNA extraídos se evaluó mediante geles de agarosa al 1.5%.

La calidad del RNA total obtenido de cada muestra, se evaluó usando el Agilent DNA high Sensitivity chip® en un equipo Agilent Bioanalyzer 2100 System®. Todas las muestras que obtuvieron un valor de RIN (número de integridad del DNA) > 7.8 fueron seleccionadas para su secuenciación. Para ello, se prepararon librerías de cDNA mediante el paquete comercial Illumina TruSeq Stranded mRNA sample preparation kit (Illumina©). Las librerías seleccionadas se secuenciaron en un equipo Illumina NextSeq500, usando el kit NextSeq 500/550 High Output v2 kit® (de 300 ciclos) para generar lecturas pareadas en formato 2 x 150 bp. La secuenciación se realizó en la Unidad de Secuenciación e identificación de polimorfismos del Instituto Nacional de Medicina Genómica, México.

### 1.3.4. Análisis de calidad de los datos de secuenciación masiva

El proceso de secuenciación produjo datos crudos, los cuales se pasaron por un proceso de evaluación de calidad, remoción de adaptadores y secuencias con bases ambiguas. Se

seleccionaron las lecturas con un valor de Phred (valor de la calidad en el llamado de nucleobases durante la secuenciación) mayor de 30 y una longitud mayor de 110 nucleótidos usando el programa Trimmomatic v0.36 toolkit (Bolger *et al.*, 2014). Las secuencias sobrerrepresentadas se eliminaron utilizando el programa BBDuk, BBmap v36.02 (http://sourceforge.net/projects/bbmap/). El programa FastQC se usó para evaluar la calidad de las lecturas antes y después del proceso de remoción de secuencias. Las lecturas crudas producto del proceso de secuenciación están depositadas en el NCBI Sequence Read Archive (SRA) bajo en bioproyecto ID PRJNA598880. Biosample accession: SUB6770239.

### 1.3.5. Ensamble *de novo* y análisis de expresión diferencial

Para la construcción del transcriptoma de referencia, los datos filtrados de cada librería se ensamblaron con el programa Trinity v2.2.036 *de novo* assembler (Haas *et al*., 2013). Las abundancias de cada transcrito fueron estimadas mapeando de manera independiente cada una de las librerías con lecturas filtradas contra el transcriptoma de referencia. Para ello, se usó el programa Kallisto (Bray *et al*., 2016) y las abundancias de transcritos se normalizaron mediante el método de normalización TPM (transcritos por millón). La expresión diferencial entre los genes de cada condición fue determinada con el programa EdgeR 2.14 (Robinson *et al*., 2009). Para cada unigen, el valor *p* asociado al valor de veces de cambio fue ajustado estimando su FDR (False Discovery Rate) (Benjamini y Hochberg, 1995). Finalmente, los genes diferencialmente expresados se definieron como aquellos que presentaban un valor de veces de cambio equivalente a logFC ≥ 0.3 ó ≤ -0.3, con un valor de FDR < 0.05.

### 1.3.6. Anotación del transcriptoma

Las proteínas traducidas se predijeron con el programa TransDecoder program (https://github.com/TransDecoder/TransDecoder/wiki) usando como entrada los transcritos ensamblados *de novo*. Para reducir la redundancia de las secuencias proteicas predichas, se empleó el programa CD-HIT (Li y Godzik, 2006), con los siguientes parámetros c = 0.97, t = 0 y n = 5. Las proteínas predichas resultantes se anotaron mediante búsqueda de homología contra la base de datos nr del National Center for Biotechnology Information

(filtrado para orden Arthropoda [NCBI: txid6656]) y las bases de datos SwissProt y TrEMBL de UNIPROT. Para estos análisis se usó el programa BLASTp, especificando un E-value > $10^{-6}$. Las secuencias proteicas también se anotaron contra las bases de datos Pfam, ontología de genes (GO) e Interpro usando el programa InterproScan5 (Jones *et al*., 2014) y contra la base de datos de eucariotas de la plataforma BlastKOALA (Kanehisa *et al*., 2016) para obtener las anotaciones de la ortología de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG por sus siglas en inglés) (KO). Los identificadores KO obtenidos fueron mapeados usando la herramienta KEGG Mapper (Kanehisa y Sato, 2020). Estos últimos datos también sirvieron para analizar las rutas metabólicas de los genes diferencialmente expresados (DEGs) que se identificaron. Además, los términos ontológicos asociados a los DEGs fueron obtenidos con el programa PANNZER2 (Törönen *et al*., 2018) y los resultados se visualizaron con REVIGO (Supek *et al*., 2011), mientras que el análisis de enriquecimiento ontológico fue realizado con el programa WEGO (Ye *et al*., 2006).

### 1.3.7. Validación de resultados por RT-qPCR

Para validar los datos obtenidos por RNA-Seq, se seleccionaron algunos de los DEGs identificados y se cuantificaron usando RT-qPCR. Para esto, se seleccionaron ocho genes sub-expresados y ocho genes sobre-expresados (Cuadro 1). Los primers que se emplearon para la detección por RT-qPCR fueron diseñados usando el programa Primer3plus (https://primer3plus.com; Untergasser *et al*., 2007). Para la RT-qPCR, se emplearon 1200 ng de RNA total de cada muestra, los cuales fueron convertidos a cDNA usando el paquete comercial Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific®). La reacción de qPCR fue llevada a cabo en un volumen final de 10 µl, usando 5 µl del reactivo Luminaris HiGreen qPCR Master mix 2x (Thermo Scientific®), 0.3 µl of de cada primer (10 µM) y 1 µl de la dilución seriada 1:5 de cDNA como molde. Las reacciones se realizaron en un equipo Rotor Gene-Q detection system (QIAGEN®), usando las siguientes condiciones de ciclado: un paso de pre-tratamiento con uracil-DNA glicosilasa (UDG) a 50°C por 2 minutos, seguido de un paso de desnaturalización inicial por 10 min a 95°C; posteriormente se emplearon 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C. Para confirmar la especificidad de los amplicones, se agregó una rampa de disociación de 60 a 90°C. La tasa de cambio fue estimada usando el método ddCt (Livak y Schmittgen, 2001). Los análisis

se realizaron por triplicado y la tasa de cambio obtenida de cada gen fue comparada con la tasa de cambio obtenida como resultado del análisis de expresión diferencial del transcriptoma.

Cuadro 1. Genes sobre-expresados y sub-expresados utilizados para validar los datos obtenidos por RNA-Seq.

| **Transcritos sobre-expresados** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| GeneBank id | GENE NAME | logFC | PValue | FDR | FC_RNA-Seq | FC_qPCR |
| XP 027216145.1 | ZNF362 | 2.00E+00 | 4.49E-09 | 1.74E-06 | 4.00 | 6.2 |
| XP 027225483.1 | ANPEP | 3.96E+00 | 6.92E-10 | 3.29E-07 | 15.59 | 7.4 |
| XP 027223206.1 | STEAP4 | 2.28E+00 | 9.20E-04 | 2.89E-02 | 4.87 | 2.8 |
| XP 027222203.1 | ELP3 | 2.12E+00 | 3.30E-05 | 2.50E-03 | 4.35 | 5.2 |
| XP 027232074.1 | UTR7 | 3.78E+00 | 1.00E-04 | 5.67E-03 | 13.71 | 6.9 |
| XP 027209294.1 | BCL2L1 | 2.07E+00 | 1.06E-06 | 1.68E-04 | 4.21 | 5.2 |
| XP 027217476.1 | LOC112840402 | 2.67E+00 | 1.91E-07 | 4.29E-05 | 6.38 | 4.5 |
| XP 027223594.1 | MYH | 3.46E+00 | 7.68E-04 | 2.57E-02 | 11.02 | 7.9 |
| **Transcritos sub-expresados** | | | | | | |
| GeneBank id | | logFC | PValue | FDR | FC_RNA-Seq | FC_qPCR |
| XP 027237967.1 | MYNN | -4.20E+00 | 6.50E-04 | 2.29E-02 | 0.0544 | 0.45 |
| XP 027207903.1 | NME7 | -7.38E+00 | 6.74E-04 | 2.34E-02 | 0.0060 | 0.2 |
| XP 027207559.1 | FUT1 | -4.62E+00 | 2.68E-05 | 2.12E-03 | 0.0406 | 0.15 |
| XP 027225737.1 | Sirt3 | -4.42E+00 | 1.29E-03 | 3.61E-02 | 0.0468 | 0.33 |
| XP 027221412.1 | NAAT1 | -5.22E+00 | 1.30E-12 | 1.52E-09 | 0.0268 | 0.2 |
| XP 027238183.1 | GSTM3 | -3.47E+00 | 2.15E-03 | 4.98E-02 | 0.0905 | 0.5 |
| XP 015905005.1 | HPPD | -6.32E+00 | 5.81E-04 | 2.12E-02 | 0.0125 | 0.4 |
| XP 027209111.1 | DNAAF5 | -2.31E+00 | 5.04E-04 | 1.91E-02 | 0.2016 | 0.6 |

## 1.4. Resultados

### 1.4.1. Características de las muestras y resultado de la cuantificación de la carga viral

Las langostas juveniles capturadas se observaron sin evidencia de heridas visibles y se clasificaron con base en la presencia o ausencia de los signos clínicos del PaV1. Se realizó la cuantificación de la carga viral de la hemolinfa de cada una de las langostas capturadas y de acuerdo al criterio establecido previamente, las langostas fueron divididas en dos

grupos: langostas clínicamente infectadas (CIL) y langostas subclínicamente infectadas (NIL). La longitud del cefalotórax en el grupo CIL fue de 28 ± 5 mm y la carga viral cuantificada por qPCR fue de 152 x $10^6$ ± 117 x $10^6$ copias virales/$ng^{-1}$ de gDNA, mientras que la longitud cefalotorácica en el grupo NIL fue de 36 ± 6 mm y la carga viral fue de 1108 ± 805 copias virales/$ng^{-1}$ de gDNA.

1.4.2. Análisis del transcriptoma

El proceso de secuenciación por RNA-seq produjo un total de 79.9 GB de datos crudos equivalentes a 485 x $10^6$ lecturas crudas, con una profundidad de secuenciación de ~24 M de lecturas crudas/librería. Después del proceso de filtrado se recuperaron 166 x $10^6$ (34.22%) lecturas de alta calidad con un valor de Q>30, las cuales se ensamblaron en 68 842 transcritos equivalentes a 50 257 unigenes con un valor de TPM > 2 (Cuadro 2).

Cuadro 2. Estadísticas generales del ensamble *de novo*

| **Estadísticas generales** | |
|---|---|
| Lecturas crudas | 485100592 (79.9 GB) |
| Lecturas limpias | 166023070 (34.22%) |
| Contenido promedio de GC% | 40.61% |
| Total de transcritos | 68842 |
| Transcritos de longitud N50 | 2079 |
| Total de unigenes (TPM) | 50257 |
| Longitud de unigenes | 201 – 28717 |
| Unigenes de longitud N50 | 2020 |

De acuerdo a los análisis PCA realizados usando los valores de abundancias de expresión de los contigs, las librerías de los grupos CIL y NIL se separaron claramente, mientras que el análisis de correlación de Pearson mostró una alta correspondencia intragrupal (Figura 1A, B y C). En el análisis de expresión diferencial se detectaron 3405 transcritos diferenciales no redundantes, de los cuales 1920 fueron sobre-expresados y 1485 fueron sub-expresados (Figura 2A, B y C).

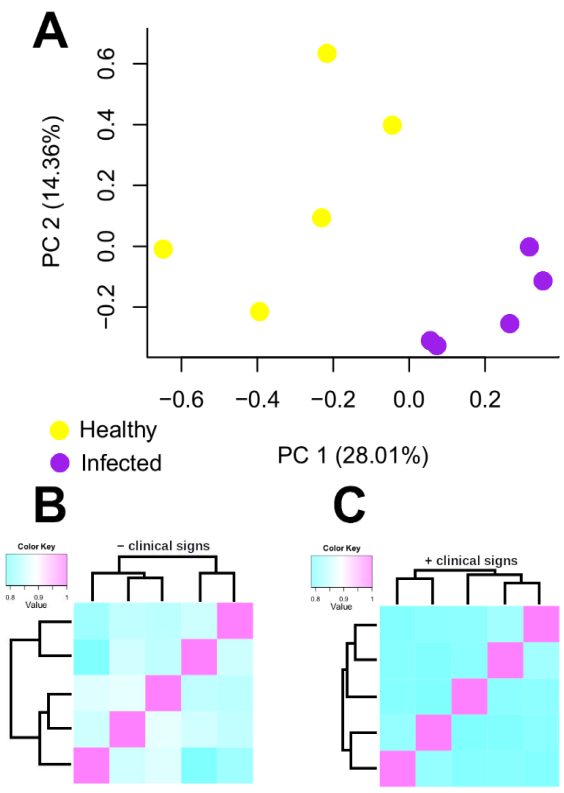


Figura 1. Estadísticas generales de calidad para las librerías generadas para cada condición experimental. A) Análisis de componentes principales (PCA) representando las librerías de cada grupo. B) Análisis de correlación de Pearson de las langostas sin signos clínicos del PaV1(- clinical signs, “Healthy”) representando la homogeneidad de los datos intragrupales. C) Análisis de correlación de Pearson de las langostas con signos clínicos del PaV1 (+ clinical signs, “Infected”) representando la homogeneidad de los datos intragrupales.

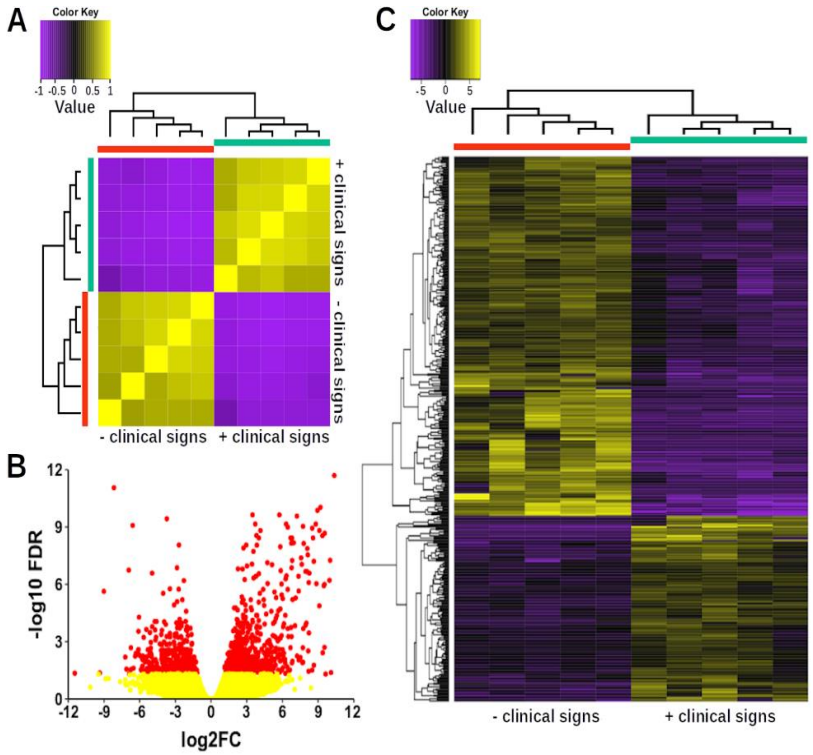


Figura 2. Estadísticas generales para los datos de cada condición experimental generadas en el análisis de expresión diferencial. A) Análisis de correlación de Pearson de las langostas sin signos clínicos de PaV1 (- clinical signs) vs langostas con signos clínicos de PaV1 (+ clinical signs) representando la separación de las librerías. B) Gráfico de volcán en el que se aprecia que la mayor cantidad de transcritos se encontraban sobre-expresados por la infección. C) Análisis de correlación de Pearson de las langostas sin signos clínicos de PaV1 (- clinical signs) vs langostas con signos clínicos de PaV1 (+ clinical signs) representando la separación de genes diferencialmente expresados (DEGs) con una tasa de cambio mayor a 2 (FC>2).

### 1.4.3. Análisis de rutas metabólicas

Las secuencias de las proteínas predichas a partir del transcriptoma se anotaron contra diferentes bases de datos. De este análisis, se pudieron anotar 15 573 transcritos en al menos una base de datos (22.91%). De entre todas las bases de datos, la nr del GenBank fue la que presentó la mayor cantidad de coincidencias únicas con un total de 2,245 genes anotados únicamente en esta base (Figura 3). En total, 379 transcritos sobre-expresados fueron anotados, muchos de los cuales estuvieron asociados a procesos biológicos tales como: fosforilación de proteínas, transporte transmembranal y biosíntesis de S-adenosilmetionina, procesos biosintéticos, organización de filamentos de actina y metabolismo de carbohidratos. Entre los transcritos sub-expresados se anotaron 232, incluidos transcritos asociados a la fosforilación de proteínas, proteólisis, regulación de la transcripción, regeneración de tejidos, metabolismo de manosa, transporte transmembranal

y señalización (Figura 4). Los DEGs también se clasificaron de acuerdo a las tres categorías principales de los términos GO (Procesos Biológicos, Componentes Celulares y Funciones Moleculares). En la Figura 5 se presentan los porcentajes de genes anotados en cada una de las tres categorías. De acuerdo a esta clasificación, los términos involucrados en procesos metabólicos [GO:8152], regulación biológica [GO:65007], regulación de procesos celulares [GO:50794] y procesos metabólicos de moléculas pequeñas [GO:44281], pertenecientes a la categoría principal “Procesos biológicos”, registraron una gran abundancia de transcritos tanto regulados como sobre-expresados. De la misma manera, en la categoría de “Función Molecular”, se encontraron de forma abundante transcritos sub-expresados para los términos unión a ligandos [GO:5488], actividad catalítica [GO:3824] y actividad oxidorreductasa [GO:16419]. En la categoría de “Componentes Celulares”, se pudieron identificar los trascritos anotados dentro del término ontológico “región extracelular” [GO:5576].

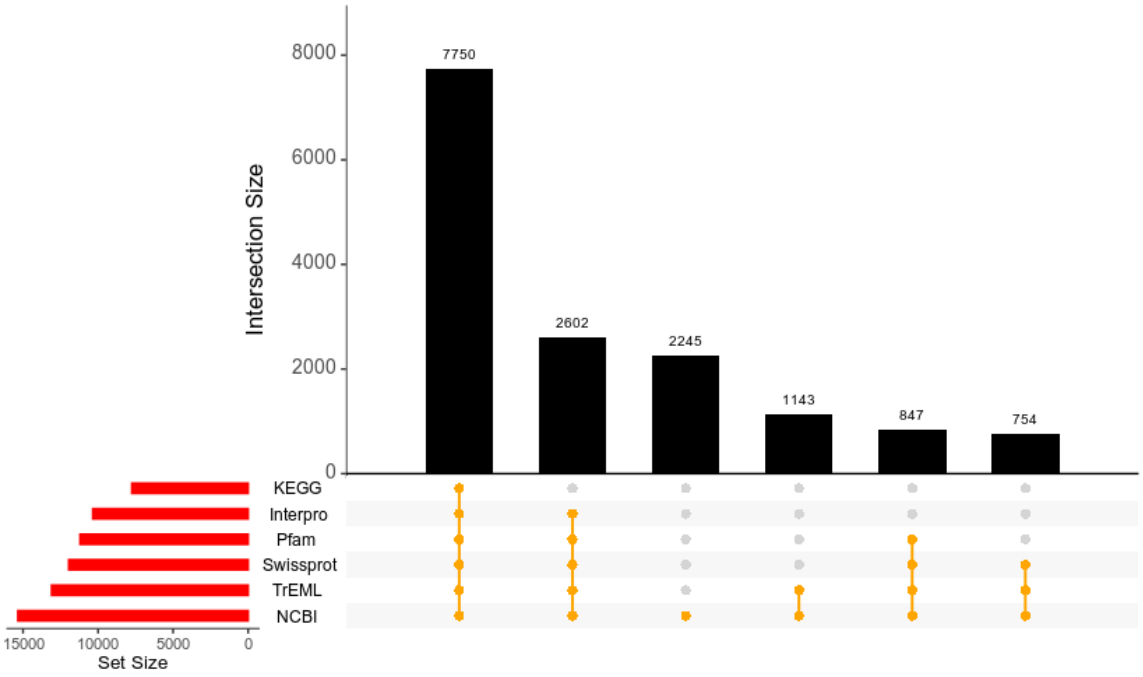


Figura 3. Gráfico Upset plot mostrando las bases de datos usadas durante el proceso de anotación y los transcritos compartidos entre ellas.

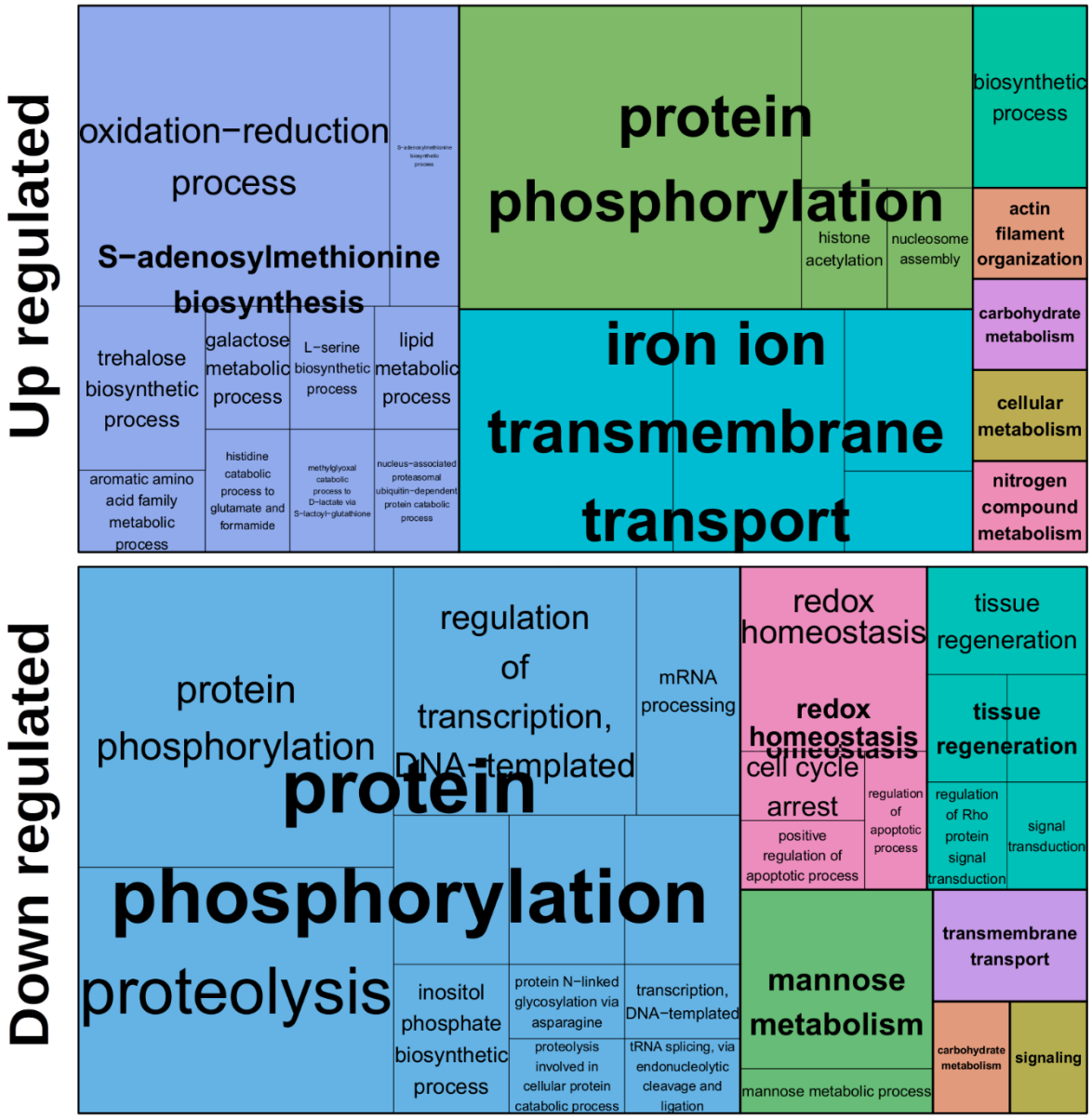


Figura 4. Gráfico de árbol de las anotaciones GO de los transcritos sobre-expresados y sub-expresados en el transcriptoma. Los procesos relacionados con la fosforilación de proteínas, el transporte transmembranal de hierro, la homeóstasis redox y la síntesis de S-adenosilmetionina se encontraron sobre-representados en los términos GO.

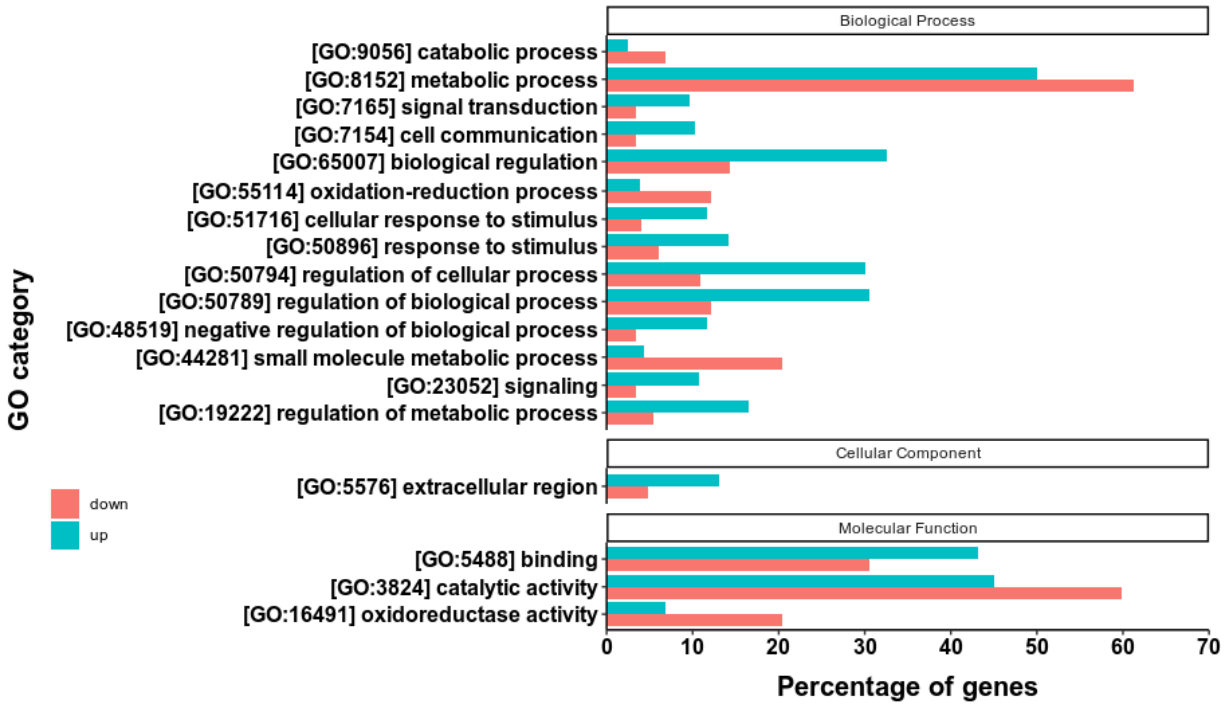


Figura 5. Análisis de enriquecimiento funcional para las categorías ontológicas anotadas para los transcritos alterados. Se muestran los términos GO más enriquecidos para las tres principales categorías GO (Procesos biológicos, componentes celulares y función molecular). En el eje X se muestra el porcentaje de genes dentro de cada categoría GO.

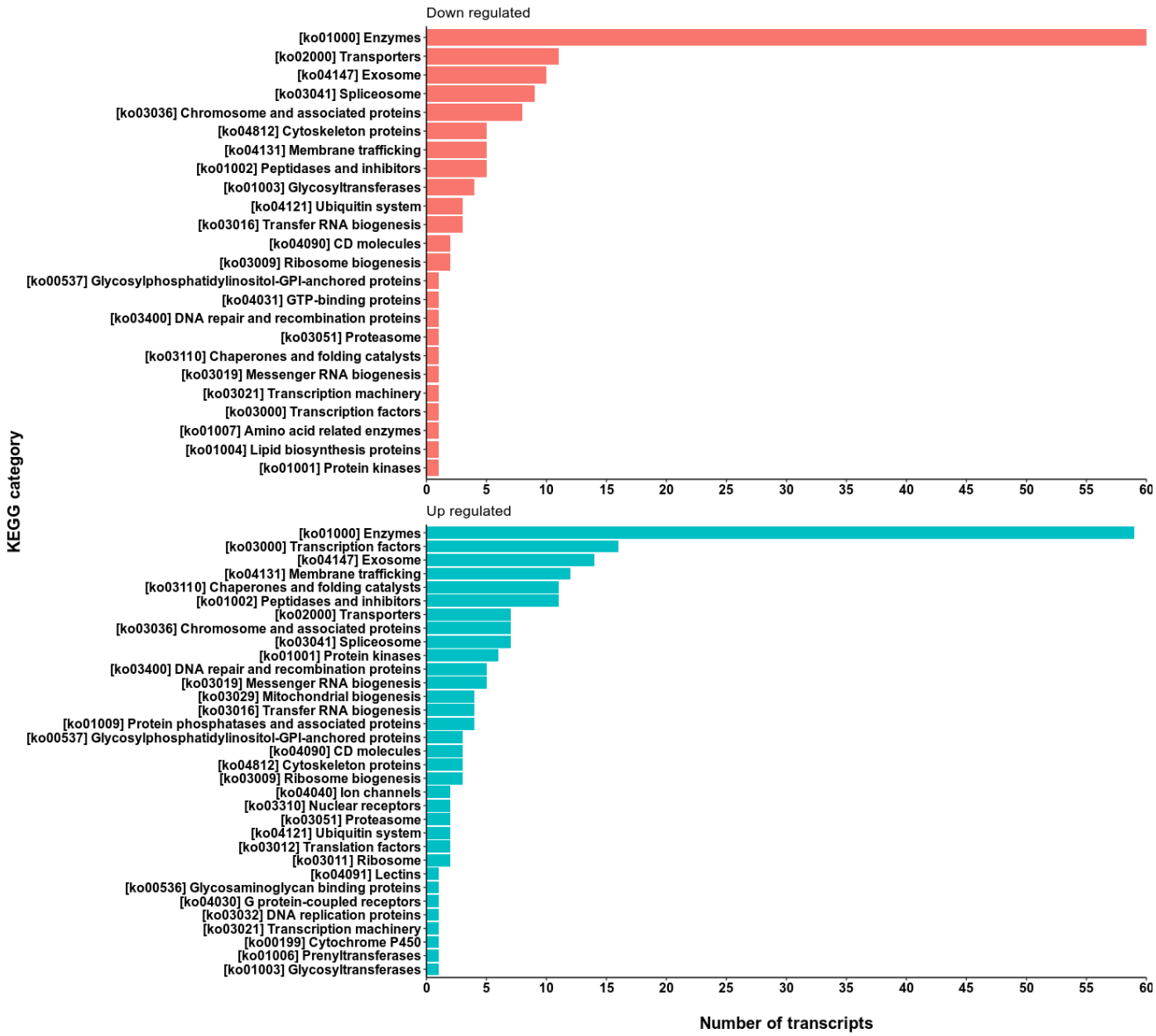


Figura 6. Transcritos diferenciales (DEG) mapeados contra la base de datos KEGG. La mayoría de los DEG codifican para enzimas. También, un gran número de transcritos que codificaban para Proteínas de transporte, Exosoma, Spliceosoma, Cromosoma y proteínas asociadas fueron encontrados sub-expresados. Términos KO como Factores de Transcripción, Exosome, Tráfico de Membrana y Chaperonas y Catálisis de Plegamiento fueron los términos más sobre-expresados.

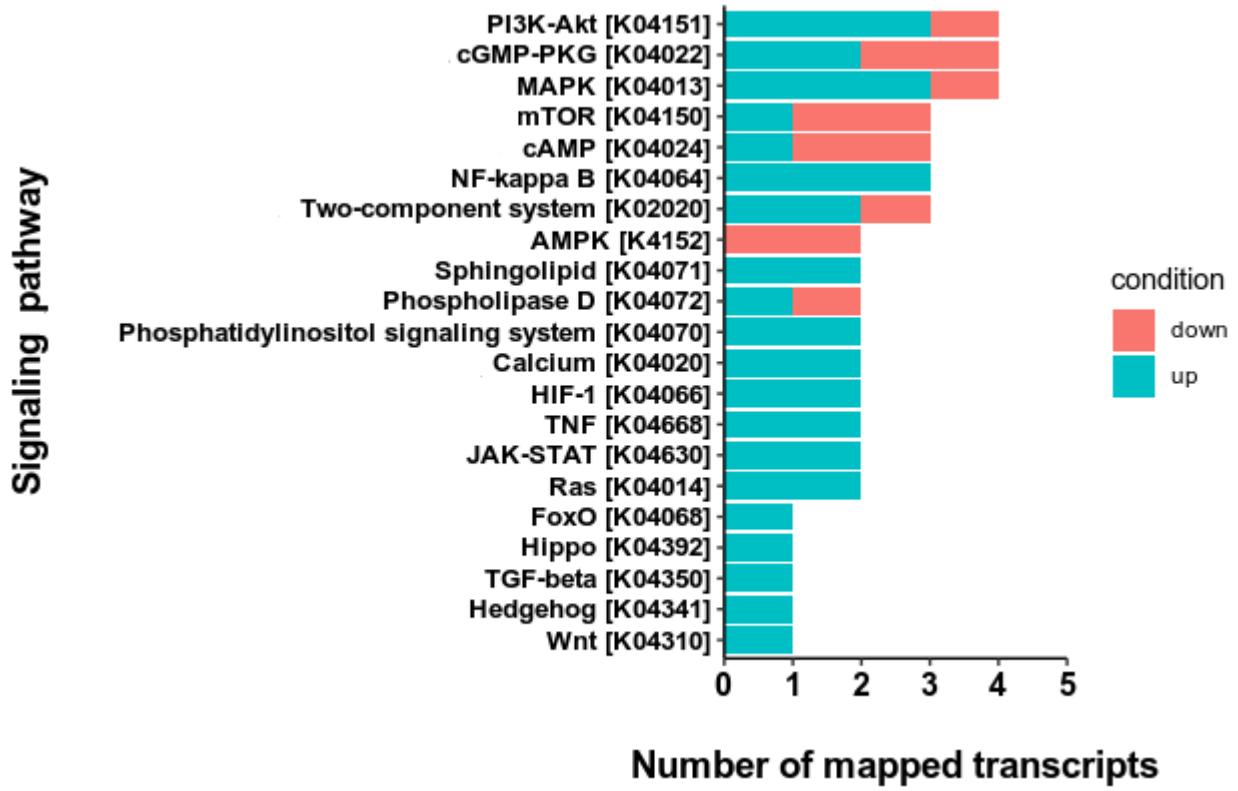


Figura 7. Términos de Rutas de Señalización como PI3K-Akt, cGMP-PKG, MAPK, mTOR, cAMP y AMPK poseen elementos alterados. Por otra parte, términos de Rutas de Señalización asociados con los procesos inmunitarios como TNF y JAK-STAT se encontraron sobre-expresados.

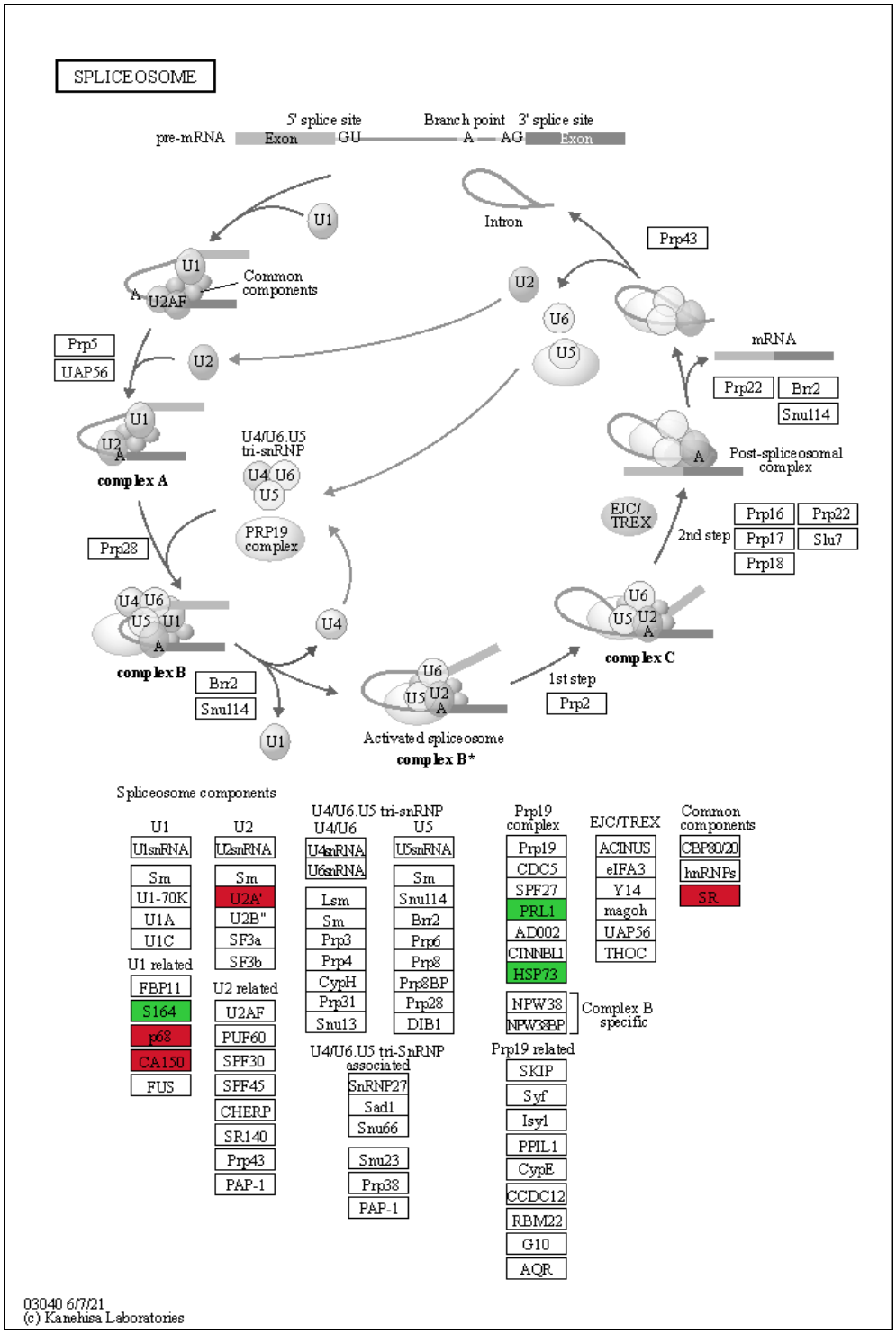


Figura 8. Identificación de los DEGs en los componentes del spliceosoma de P. argus infectado con PaV1. Cajas en color rojo: genes sub-expresados. Cajas en color verde: genes sobre-expresados.

### 1.4.4. Validación de datos transcriptómicos mediante RT-qPCR

La validación por RT-qPCR de la expresión de ciertos DEGs mostró un patrón de expresión similar al observado en los resultados de RNAseq (Figura 9). La correlación entre los datos transcriptómicos y los análsis qPCR fue evaluada utilizando un test de Spearman el cual mostró una correlación significativa (R = 0.9057, $p < 0.0001$).

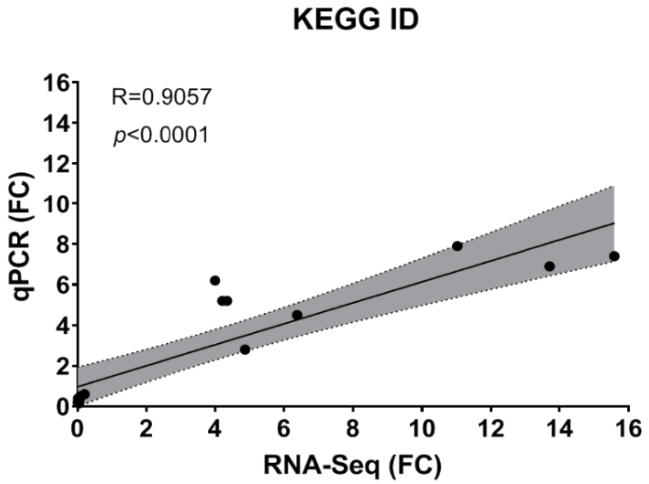


Figura 9. Prueba de Spearman mostrando una correlación entre los patrones de expresión obtenidos por RNAseq y por RT-qPCR.

## 1.5. Discusión

El PaV1 ejerce un impacto negativo en los órganos de su huésped a nivel sistémico, incluyendo afectaciones profundas a su sistema digestivo, lo que lleva a una disfunción metabólica substancial que eventualmente resulta en la muerte del organismo infectado (Li *et al*., 2008; Pascual-Jiménez *et al*., 2012; Herrera-Salvatierra *et al*., 2019; Zamora-Briseño *et al*., 2020a; Zamora-Briseño *et al*., 2020b). Dado que el intestino es un órgano clave para el funcionamiento de los procesos digestivos y de absorción de nutrientes y juega un rol clave en la homeóstasis de los crustáceos y dado que se desconocen los cambios transcriptómicos ocurridos en este órgano como resultado de la infección por PaV1, se decidió hacer un análisis de transcriptómica comparativa para entender dichos cambios. En

este capítulo se presentan los resultados del escrutinio transcriptómico de los intestinos de langostas infectadas con Pav1 en estados diferentes de la infección y los principales hallazgos se discuten a continuación.

### 1.5.1 Alteración de la maquinaria de regulación transcripcional

Trabajos previos han presentado evidencia sobre la reducción de las reservas metabólicas (la cual está relacionada con una disminución en la actividad de las rutas del metabolismo energético primario) y la destrucción masiva de ciertos tipos celulares, como ocurre con los hemocitos, lo cual resulta en afectaciones tanto estructurales como funcionales en prácticamente todos los órganos del hospedero (Li *et al*., 2008; Pascual-Jiménez *et al*., 2011; Zamora-Briseño *et al*., 2020a). Sin embargo, la destrucción celular y el agotamiento metabólico es consecuencia final de un proceso que comienza con la desregulación de la expresión génica en las células infectadas. En este sentido, la sobre-expresión de factores de transcripción (FT) es importante, ya que estos genes controlan una gran cantidad de genes subordinados.

En este trabajo, se encontró la sobre-expresión de transcritos que codifican para factores Krüppel-like factors (KLFs). Los genes KLFs pertenecen a una familia de FTs bien conocida, caracterizada por la presencia de un dominio DNA-binding de tres dedos de zinc y un dominio N-terminal variable que es responsable del reclutamiento de cofactores transcripcionales que controlan la expresión de genes involucrados en el metabolismo y otros procesos celulares (Schuh *et al*., 1986; Groenendijk *et al*., 2004; Feinberg *et al*., 2007; Zahlten *et al*., 2013). En *Penaeus vannamei*, ciertos KLFs se han asociado con la regulación del sistema inmune. Por ejemplo, *Pv*Kruppel regula la expresión de la subunidad pequeña del gen de hemocianina, el cual es clave para el transporte de oxígeno y la regulación del sistema inmune (Yang *et al*., 2020). De igual forma, en *Penaeus monodon* se ha demostrado la importancia de los factores KLF en el sistema inmune. En este modelo se observó que el silenciamiento del factor *Pm*KLF trae como consecuencia una reducción del número de copias virales en camarones infectados con el virus de la mancha blanca (WSSV) (Chang *et al.*, 2012).

Otro FT que se encontró sobre-expresado en este trabajo fue el regulador pleiotrópico 1 (PLRG1). Este FT es importante para la homeostasis tisular y la proliferación celular, así como en la supresión de la apoptosis (Kleinridders *et al*., 2009). También se observó la sobre-expresión del gen NFkB2, el cual es parte del complejo transcripcional factor-kappa-B nuclear (NfkB), un activador central de genes involucrados en funciones inflamatorias e inmunes (Tak y Firestein, 2001). La activación de las rutas Toll y de inmunodeficiencia (IMD) del factor NfkB llevan a la producción de péptidos antimicrobianos (AMPs) los cuales combaten las infecciones bacteriales, fúngicas y virales (Li *et al*., 2018). Sin embargo, este gen también es clave en el desarrollo de los ciclos virales. Por ejemplo, cuando *M. japonicus* se infecta con WSSV, se activan microRNAs virales (WSSV-miR-N13 y WSSV-miR-N23) cuyo objetivo es suprimir la ruta spz-toll-dorsal-ALF, una ruta de activación de la señalización antiviral (Wang *et al*., 2011). También se ha observado que el virus ejerce control sobre el complejo Dorsal/Cactus, un activador de la ruta Dorsal-Toll del factor NfkB, por lo que el virus es capaz no sólo de regular la liberación de AMPs sino también de regular la transcripción de tres genes virales (Li *et al*., 2019). Por tanto, la sobre-expresión del factor NfkB en etapas avanzadas de la infección por PaV1 puede deberse a la acción del virus sobre este mecanismo.

Otro proceso central para la regulación de la expresión génica es el “esplicing” alternativo, un proceso complejo donde los intrones (regiones no codificantes del ADN que forma parte de la transcripción primaria del ARN), presentes en los transcritos inmaduros que se remueven previo a su traducción (Wang *et al*., 2015). Este proceso es mediado por un complejo ribonucleoprotéico, el espliceosoma, tan importante que es capaz de determinar las propiedades de unión, localización intracelular, actividad enzimática, estabilidad proteica y modificaciones post-transcripcionales de un gran número de proteínas (Stamm *et al*., 2005; Matera *et al*., 2014). Por tanto, las alteraciones en este mecanismo pueden producir defectos sobre la maduración de mRNA, lo cual está relacionado con la aparición de diversas enfermedades (Novoyatleva *et al*., 2006; Chen y Manley, 2009; Ward y Cooper, 2010). En este trabajo se observaron algunos transcritos relacionados con la regulación del espliceosoma. Por ejemplo, los transcritos que codifican para la RNA helicasa dependiente de ATP DDX5/DBP2 se encontraron sub-expresados. Esta proteína favorece la transición del espliceosoma a su estado activo por medio del desenrollamiento del dúplex entre el RNA

pequeño nuclear U1 y el sitio de splice 5' (Lin *et al*., 2005; Camats *et al*., 2008), y está involucrada en el procesamiento de mRNAs y microRNAs, la biogénesis del ribosoma, la degradación de RNAs y la regulación de RNAs largos no codificantes. DDX5/DBP2 también está implicada en la regulación de rutas de señalización celular y en el metabolismo energético (Jalal *et al*., 2007; Lin *et al*., 2005; Lin *et al*., 2013; Liu, 2002; Wilson *et al*., 2004). Otro transcrito que se encontró sub-expresado fue el factor de esplicing rico en arginina/serina 1 (ASF1/SF2), un factor específico y esencial para el esplicing de pre-mRNAs y procesos post-esplicing como la exportación de mRNA nucleares y la traducción (Kim *et al*., 2009; Michlewski *et al*., 2008; Will y Lührmann 2011; Zuo y Manley 1993). Otro transcrito sub-expresado fue el de la ribonucleoproteína nuclear heterogénea (hnRNP F/H). Esta proteína es parte de la familia hnRNP, la cual está involucrada en todos los aspectos del metabolismo de RNA citoplásmico y nuclear, incluyendo el procesamiento de mRNA, la reparación del DNA, la exportación nuclear, la localización y estabilidad de mRNAs. Además, juega un rol especializado en la unión a transcritos específicos (Dreyfuss *et al*., 2002; Kalifa *et al*., 2006; Chaudhury *et al*., 2010).

En crustáceos se han reportado alteraciones en el espliceosoma en células del intestino de *Macrobrachium rosenbergii* infectado con patógenos como el virus de la mancha blanca (WSSV) o *Vibrio parahaemolyticus* (Jung *et al*., 2011). Se considera que las alteraciones del espliceosoma en células de tejido branquial de *Procambarus clarkii* podrían tener un efecto antiviral (Du *et al*., 2018). Este es el primer reporte de los efectos del PaV1 en la maquinaria del espliceosoma de *P. argus*, pero las consecuencias biológicas de los cambios descritos aquí deben ser evaluados a profundidad y de manera puntual. Basados en la observación de la desregulación de varios factores transcripcionales maestros, así como la desregulación de varios elementos del espliceosoma, se sugiere que el PaV1 es capaz de controlar la regulación transcripcional de las células infectadas en langostas con altas cargas virales.

### 1.5.2. Cambios inducidos por el PaV1 en procesos transcripcionales, proteínas citoesqueléticas y la homeostasis del hierro

A la fecha no se sabe cómo el PaV1 manipula la maquinaria post-traduccional en las células del hospedero. En este trabajo se observaron afectaciones en varios transcritos codificantes para proteínas involucradas en la regulación post-traducional en las langostas clínicamente infectadas. Se observaron sobre-expresadas algunas proteínas de choque térmico (HSPs), conocidas por su función como chaperonas durante el plegamiento de polipéptidos recién sintetizados inducidos en respuesta al daño celular, el choque térmico, la radiación UV e infecciones virales y bacterianas (Dudeja *et al*., 2009). Existen HSPs que protegen el epitelio intestinal contra el estrés oxidativo y la inflamación y que son conocidos por estar involucrados en la respuesta inmune y la apoptosis (Dudeja *et al*., 2009; Kumar *et al*., 2011; Arnal y Lallés, 2016). Por ejemplo, se ha observado que la HSP90 es un receptor intracelular de glucocorticoides durante las respuestas al estrés (Petrof *et al*. 2004; Romero-Brey y Bartenschlager, 2016). Sin embargo, las HSPs también pueden promover la replicación viral de ciertos virus (González *et al*., 2009; Kumar *et al*., 2011; Rathore *et al*., 2014; Bolhassani y Agi, 2019). Con base en nuestras observaciones, es necesario que se lleven a cabo trabajos experimentales sobre estas proteínas para lograr esclarecer el papel que realizan, ya que pueden ser parte de la estrategia de PaV1 para manipular la maquinaria celular.

Durante las infecciones virales, la formación de puentes disulfuro es muy importante para regular los mecanismos utilizados por los virus para penetrar en la célula y replicarse, así como en el mantenimiento de la estabilidad de la cápside viral y la maduración de viriones (Hakim y Fass 2010). En este contexto, es notable la sobre-expresión de la proteína disulfuro isomerasa A1 (PD1A1), A3 (PD1A3) y GRP58 en langostas infectadas con PaV1. Estas proteínas son chaperonas redox que catalizan la isomerización de puentes disulfuro en las proteínas. En particular, PDIA3 interactúa con dos proteínas chaperonas de unión a lectina, calreticulina y calnexina, y actúa modulando el proceso de plegamiento de glicoproteínas recién sintetizadas (Coe *et al*., 2012). La calreticulina es una proteína chaperona altamente conservada que reside primordialmente en el Retículo Endoplasmático (RE) y está involucrada en múltiples procesos celulares como adhesión celular y regulación de la concentración del calcio intracelular (Huang *et al*., 2019). La calnexina por su parte, es una proteína integral que participa en el control de calidad del plegamiento proteico y la homeostasis de calcio en conjunto con la calreticulina. En *Penaeus japonicus*, la calreticulina ha sido descrita como un factor clave para el desarrollo de la

infección por WSSV, ya que las proteínas de la cápside viral interactúan con proteínas lectinas facilitando la entrada del virus (Wang *et al*., 2014).

También se detectaron cambios en la regulación de proteínas relacionadas con la regulación del citoesqueleto, las cuales pueden estar involucradas en completar el ciclo viral. Este es el caso de la chaperonina citosólica que contiene TCP-1(CCT), cuyo transcrito se encontró sobre-expresado en langostas con altas cargas virales. Esta proteína ayuda al plegamiento de proteínas citosólicas como tubulina, actina y varios reguladores de la división celular; participa en la formación del citoesqueleto (Nadler-Holly *et al*., 2012), y es importante para la transcripción y replicación de virus en otros animales (Zhang *et al*., 2013; Zhang *et al*., 2014). También se observó una sobre-expresión de los transcritos que codifican para GTPasas Rho, un grupo de proteínas que regulan la actina y la dinámica de los microtúbulos (Sadok y Marshall, 2014). Esto es significativo porque varios virus interactúan con GTPasas Rho para manipular estas proteínas en beneficio propio (Van den Broeke *et al*., 2014). Basado en estas observaciones preliminares, se hipotetiza que el PaV1 es capaz de manipular los reguladores del citoesqueleto y asegurar el control coordinado de otras actividades celulares través de sus interacciones con proteínas citoesqueléticas.

También se detectó la inducción de catepsinas B, D, L y K en langostas infectadas con PaV1. En mamíferos, la inducción de estas proteínas contribuye en procesos patológicos gastrointestinales a través de respuestas inflamatorias (Medina y Radomski, 2006; Menzel *et al*., 2006; Vreemann *et al*., 2009). De igual forma, las catepsinas B y L han sido descritas durante la respuesta inmune de *Penaeus chinensis* (Ren *et al*., 2010; Li *et al*., 2013). La catepsina B (CTSB) es una proteasa lisosomal de cisteína involucrada en la degradación de proteínas lisosomales y es clave en el ciclo de varios virus pues activa las glicoproteínas de la superficie viral, lo cual lleva a la fusión de las partículas virales con la membrana endosomal, causando la liberación viral desde los endosomas hacia el citoplasma (Coleman *et al*., 2018). Esto es importante porque las actividades de tráfico membranal son fundamentales para asegurar una replicación adecuada y la propagación de los virus (Belov y Ehrenfeld, 2007). En relación a lo anterior, se observó la desregulación de transcritos asociados a proteínas endosomales como la proteína STEAP3 (Ohgami *et al*., 2006) y la cadena pesada de ferritina (FTH1). La proteína FTH1 entrega el hierro a las células y es esencial para la homeostasis de hierro ya que este se almacena en una forma soluble y no

tóxica para la célula (Polati *et al*., 2012). También se ha reportado que la función de FTH1 puede ser negativamente afectada por la interacción con proteínas virales incrementando la concentración de hierro (Fe) en el citoplasma (Lv *et al*., 2016).

### 1.5.3. Desregulación de las rutas de señalización celular y procesos de transporte membranal

Usualmente, las rutas de señalización son mediadas por procesos de fosforilación que son importantes para la respuesta inmune del hospedero (Bradshaw y Dennis, 2009). En este sentido, cabe destacar que se identificaron varios elementos asociados con la respuesta inmune innata y con la sobre-expresión de genes involucrados en las respuestas antivirales, como los implicados en la regulación de especies reactivas de oxígeno o de nitrógeno o elementos de la ruta de señalización JAK-STAT (Du *et al*., 2016; Lange *et al*., 2018; Ding *et al*., 2018). De forma similar, las rutas cGMP y mTOR son comúnmente activadas para combatir infecciones virales (Scheiner *et al*., 2004; Moreno-Altamirano *et al*., 2019). Estas rutas modulan la respuesta inmune del hospedero y para mantener la replicación viral una vez que el virus ha tomado el control de la maquinaria celular. Por ejemplo, para entrar a las células, algunos virus requieren de la activación de proteínas de señalización como PI3K, las kinasas activadas por mitógenos (MAPK), el factor nuclear kappa B (NF-kappaB), la proteína kinasa c (PKC) y los receptores de tirosina quinasa (TKR) (García *et al*., 2009; Kumar *et al*., 2011; Ayllon *et al*., 2012; White *et al*., 2017).

El factor NF-Kb es considerado como uno de los principales blancos para los patógenos virales debido a que su activación temprana promueve la respuesta inmune del hospedero, pero también puede ser secuestrado por los virus para promover la replicación viral (García *et al*., 2009; Ding *et al*., 2017; Yang *et al*., 2020). Esto también ocurre en la ruta de señalización de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK). Esta ruta regula el metabolismo energético y se activa cuando los niveles de ATP se reducen, con el fin de mantener estables los niveles de ATP (Mihaylova *et al*., 2011). Nuevamente, la ruta AMPK tiene una acción dual durante las infecciones virales debido a que puede ser tanto como positivo como dañino para el hospedero dependiendo del virus invasor (Yin *et al*., 2017;

Seong *et al*., 2018). Con base en los resultados de los datos obtenidos, es probable que el PaV1 inhiba la ruta AMPK, lo cual puede afectar la cantidad de ATP a nivel celular.

El epitelio intestinal de los crustáceos está involucrado en la absorción de agua y el transporte de iones, funciones que son importantes para la osmorregulación y la absorción de nutrientes (Chung y Lin, 2006). En este sentido, es probable que la sub-expresión de las subunidades α y β de la ATPasa sodio/ potasio ($Na^+/K^+$-ATPase) en langostas infectadas sea relevante, ya que este transporte puede afectar la osmorregulación al participar en el transporte de iones $Na^+$ y $K^+$ a través de la membrana celular, así como otras funciones como la transducción de señales, las especies reactivas de oxígeno, el volumen celular y el transporte de calcio (Clausen *et al*., 2017). Por otra parte, tanto el contenido de reservas energéticas en forma de glicógeno como la actividad de la glicólisis, son de particular importancia para la $Na^+/K^+$ ATPasas, ya que una disminución en el glicógeno reduce la disponibilidad del ATP vía glicólisis, el cual es necesario debido a los altos requerimientos energéticos de la $Na^+/K^+$-ATPasa (Watanabe y Wada, 2019). Esto coincide con el hecho de que durante los últimos estadios de la infección por PaV1, las langostas sufren un marcado decremento en el contenido de las reservas de energía en forma de glicógeno en el hepatopáncreas (Shields y Behringer, 2004; Pascual-Jiménez *et al*., 2012; Herrera-Salvatierra *et al*., 2019; Zamora-Briseño *et al*., 2020a). Relacionado con esto, se considera que la sub-expresión de la subunidad 1 de la flavoproteína succinato deshidrogenasa (SDHA) podría tener un efecto importante en la producción de energía debido a que es una parte central del complejo II succinato deshidrogenasa (SDH) de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (ETC). De manera general, el complejo proteico SDHA está localizado en la membrana mitocondrial y cataliza la oxidación del succinato. Los electrones removidos del succinato son transferidos de la SDHA hacia las subunidades SDHC/SDHD del extremo hidrofóbico de la membrana mitocondrial. Después, los electrones son transferidos a la ubiquinona Q y finalmente al complejo III y IV de la ETC, donde son usados en la generación de ATP (Horsefield *et al*., 2006). Por tanto, la reducción en el contenido de SDHA puede resultar en una disminución en la producción de ATP mediante fosforilación oxidativa.

### 1.5.4. Regulación de las proteasas digestivas

En crustáceos, la producción de las enzimas digestivas es afectada por el estadio del ciclo de vida, el estado de muda, los ciclos circadianos, la composición del alimento y las condiciones medioambientales. Entre las enzimas digestivas, las proteasas son importantes para hidrolizar las proteínas del alimento y convertirlas en pequeños péptidos y aminoácidos libres (López-Otín *et al*., 2008; Perera *et al*., 2008). En este sentido, es de resaltar que en langostas infectadas con PaV1 se observaron desregulados muchos transcritos que codifican proteasas digestivas. En estudios previos, tanto la actividad de la tripsina como la de la quimotripsina se usaron como indicadores de la capacidad digestiva de langostas en respuesta al PaV1 y se observó que la actividad enzimática de estas proteínas disminuyó (Herrera-Salvatierra *et al*., 2019), lo cual coincide con que la abundancia de estas enzimas disminuyó en el hepatopáncreas de langostas infectadas (Zamora-Briseño *et al*., 2020a). También se encontró que el transcrito que codifica para la proteasa de serina con dominio clip PPAF-2 se sub-expresó. Este dominio es parte del factor activador de la profenoloxidasa (PPAF)-II y es indispensable para la generación de fenoloxidasa activa, la cual conduce a la melanización, uno de los principales mecanismos de defensa de los crustáceos (Ma *et al*., 2014). Por tanto, su desregulación podría afectar la activación de este proceso inmune.

## 1.6. Conclusión

Los datos generados en este capítulo sugieren que el PaV1 afecta la regulación de genes involucrados en procesos biológicos relacionados en proveer de energía a la célula. También es notorio que la osmorregulación podría ser afectada por la falta de energía disponible para cumplir con los altos requerimientos de los mecanismos de transporte. Este estudio provee datos que revelan la existencia de alteraciones en algunos de los elementos de las rutas de señalización que son vitales para la activación del sistema inmune, así como para la entrada de los virus. Algunas funciones alteradas asociadas con los factores de transcripción, el complejo del espliceosoma, el transporte de hierro y los procesos de fosforilación sugieren que el PaV1 puede usar la maquinaria metabólica de la célula para promover sus propios procesos de replicación. Finalmente, las proteínas alteradas asociadas con el retículo endoplásmico y la formación del citoesqueleto y su mantenimiento

pueden ser clave para la penetración del virus en la célula y el ensamblaje de la cápside viral. Se recomiendan futuras investigaciones sobre los DEGs encontrados en este trabajo para mejorar la comprensión sobre los procesos de respuesta inmunitaria y el ciclo de replicación del virus del PaV1 como las rutas de entrada membranal del virus y las proteínas de replicación viral. Los datos generados en este trabajo proveen evidencia preliminar de los mecanismos moleculares detrás de los signos y cambios descritos durante la infección por PaV1 en *P. argus*.

Los resultados de este capítulo se han publicado en:

Hernández-Velázquez, I. M., Zamora-Briseño, J. A., Pereira-Santana, A., Huchin-Mian, J. P., González-Penagos, C. E., Pérez-Vega, J. A., ... & Rodríguez-Canul, R. (2022). A first glimpse into the transcriptomic changes induced by the PaV1 infection in the gut of Caribbean spiny lobsters, *Panulirus argus* (Latreille, 1804) (Decapoda: Achelata: Palinuridae). *Virus Research*, *311*, 198713. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198713

## CAPÍTULO 2: ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS CAMBIOS METABÓLICOS QUE OCURREN EN LAS GLÁNDULAS ANTENALES DE LA LANGOSTA ESPINOSA DEL CARIBE, *PANULIRUS ARGUS* (LATREILLE, 1804), INFECTADA CON EL PANULIRUS ARGUS VIRUS 1

### 2.1. Introducción

Los virus patógenos pueden manipular la maquinaria de sus hospederos para su propio beneficio. Procesos como la replicación y la propagación viral usualmente tienen como consecuencia efectos negativos en múltiples órganos, lo que frecuentemente ocasiona agotamiento de nutrientes y desórdenes metabólicos en general (Wang, 2014; Kvansakul, 2017; Liu *et al*., 2019). Este patrón parece ocurrir durante la infección por PaV1, pero a pesar de reportes previos sobre desequilibrios metabólicos ocurridos en órganos clave en langostas infectadas (Li *et al*., 2008; Pascual-Jiménez *et al*., 2012; Herrera-Salvatierra *et al*., 2019; Zamora-Briseño *et al*., 2020b), las principales alteraciones que ocurren en el metaboloma de los hospederos durante esta enfermedad viral se desconocen aún.

Una manera de llevar a cabo la identificación de alteraciones en los metabolitos, es a través de enfoques metabolómicos, los cuales son útiles para contestar preguntas clave acerca de las enfermedades y otras condiciones disfuncionales en cualquier especie (Delgado *et al*., 2012; Chen *et al*., 2017). Además, los perfiles metabolómicos han sido utilizados para identificar biomarcadores de enfermedades y para desarrollar métodos de diagnóstico novedosos y terapias clínicas (Wang *et al*., 2013b). Los perfiles metabólicos también pueden ayudar a entender las bases bioquímicas de una enfermedad, así como los cambios de comportamiento que ocurren como consecuencia de un fenómeno fisiológico determinado (Sanchez y Lagunoff, 2015; Oromi *et al*., 2017; Liu *et al*., 2019; Humer *et al*., 2020).

En el medio natural, las langostas sanas son capaces de detectar y de evitar a las langostas enfermas. Este comportamiento de evitación que presentan las langostas sanas es mediado probablemente por feromonas o señales químicas liberadas al ambiente vía fluidos corporales u otros mecanismos (*e.g.*, orina, hemolinfa, epitelio branquial, heces), que son

capaces de modificar el comportamiento intra o interespecífico de los organismos (Savic *et al*., 2009; Wyatt, 2009; Yao *et al*., 2009; Behringer y Butler, 2010; Berry y Breithaupt, 2010; Bauer, 2011; Candia-Zulbarán *et al*., 2015). Las señales químicas emitidas por las langostas sirven para identificar a otras langostas, para elegir refugios apropiados y para la identificación de depredadores. Sin embargo, estas señales pueden ser alteradas por cambios asociados a su fisiología y el ambiente. Por ejemplo, de la misma forma descrita para langostas infectadas con PaV1, los cambios drásticos en la temperatura ambiental, salinidad y pH, son capaces de alterar el comportamiento mediado por quimiorrecepción en langostas, de modo que pierden la capacidad de reunirse con conespecíficos sanos y pierden la capacidad de evitar a los depredadores y conespecíficos enfermos (Ross y Behringer, 2019).

En langostas espinosas, el uso de señales químicas transmitidas por la orina durante las interacciones intra-específicas es bien conocido; en *P. argus*, la orina es la fuente principal de señales de alarma y feromonas y es liberada desde la glándula antenal, el órgano secretor principal de las langostas (Freire *et al*., 2008; Aggio y Derby, 2011; Tsai y Lin, 2014). Estas señales químicas dependen del estatus metabólico del animal y los perfiles metabólicos pueden ser útiles para entender los cambios ocurridos durante la infección por PaV1 (Stowers y Liberles, 2016). Por tanto, un análisis metabólico de la glándula antenal podría arrojar luz sobre las bases del comportamiento de evitación observado en langostas sanas y puede proveer de un mejor entendimiento sobre la desregulación de los metabolitos causada por el PaV1. En este trabajo se presentan los resultados del análisis metabolómico comparativo de la glándula antenal de *P. argus* juveniles con signos clínicos de PaV1 y sin signos clínicos de la infección.

## 2.2 Hipótesis y objetivo

### 2.2.1. Hipótesis

Se observarán alteraciones a nivel metabólico en langostas infectadas con PaV1 en comparación con langostas no infectadas con el virus PaV1.

### 2.2.2 Objetivos

Identificar las alteraciones metabólicas en la glándula antenal de *Panulirus argus* en respuesta a la infección por PaV1

## 2.3. Materiales y métodos

### 2.3.1. Captura de langostas

En noviembre de 2018 se capturaron organismos juveniles de *P. argus* con una longitud cefalotorácica (CL) de 15 mm a 40 mm en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, México (20°51'N, 86°53'W), usando redes de mano. Esta laguna arrecifal es parte del sistema de arrecifes de coral localizado al norte de la costa de la Península de Yucatán. Las langostas se mantuvieron en condiciones de aireación, se separaron por sexo y de acuerdo con la presencia o ausencia de signos clínicos de PaV1 (Candia-Zulbarán *et al*., 2015, 2019). En este estudio sólo se utilizaron langostas con apéndices completos y sin rastro de heridas.

### 2.3.2. Recolección de muestras

Los animales seleccionados se anestesiaron colocándolos en agua fría (4°C aproximadamente) por 10 min y se sacrificaron cortando el cordón nervioso central (Pascual-Jiménez *et al*., 2011). Posteriormente, se colectaron 2 mL de hemolinfa de cada langosta, a las que también se les disecó la glándula antenal. La hemolinfa se obtuvo usando una jeringa con dos volúmenes de solución anticoagulante (NaCl 450 mM, KCl 10 mM, HEPES 10 mM, EDTA 10 mM, pH 7.0) (Vargas-Albores et al. 1993) mantenida a 4°C. La hemolinfa fue centrifugada por 5 minutos a 2 500 x *g* y 4°C. Se descartó el sobrenadante y las células (hemocitos) se fijaron en dos volúmenes de solución DNA/RNA shield (Zymo Research©). Los hemocitos se usaron para la extracción del DNA genómico (gDNA) con el fin de realizar la cuantificación de la carga viral. Las muestras de glándula antenal se congelaron con nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C.

### 2.3.3. Cuantificación viral por qPCR

La carga viral se cuantificó por qPCR, siguiendo el procedimiento validado previamente por Clark *et al*. (2018), con modificaciones menores. El gDNA de los hemocitos se obtuvo usando el paquete comercial universal Quick-DNA™ kit (Zymo Research©) y la integridad del gDNA se comprobó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. A partir de este gDNA, se obtuvo un amplicón de 499 bp del genoma del PaV1 usando el protocolo de Montgomery-Fullerton *et al*. (2007). Los amplicones se clonaron con el paquete comercial de clonación CloneJET PCR Cloning Kit™ (Thermo Scientific©) y el plásmido recombinante resultante se usó como plantilla para cuantificar la carga viral del PaV1 mediante una curva estándar. Para ello, se realizaron diluciones seriadas (1:5) del plásmido recombinante para obtener un rango dinámico de detección de 30 hasta $3 \times 10^9$ copias virales. La reacción de qPCR fue llevada a cabo en un termociclador Rotor Gene® real-time PCR en un volumen final de reacción de 10 µL, con 5 µL de sonda QuantiNova Probe PCR (QIAGEN©), 0.15 µM de cada primer, 0.3 µL de PaV1-TaqMan 20X y 2 µL de la dilución del plásmido o 2 µL (65-140 ng) de gDNA de cada muestra. Las condiciones de ciclado fueron 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 62°C.

### 2.3.4. Extracción de metabolitos

La extracción de metabolitos se realizó usando el protocolo modificado para la extracción de metabolitos polares con solventes de grado espectroscópico de Sapcariu *et al*., 2014. Las glándulas antenales se trataron con 800 µL de metanol enfriado a -20°C. Después, se añadieron 80 µL de agua ultrapura enfriada a 4°C y la mezcla se agitó por 5 min. Luego, se agregaron 800 µL de cloroformo, se mezcló por 20 min y la mezcla se centrifugó por 5 min a 16 000 x *g* a 4°C. La fase acuosa con los metabolitos polares se separó y secó por liofilización. El extracto liofilizado (100 mg) se solubilizó en 300 µL de buffer fosfato (1 M $Na_2HPO_4$ y 1 M $NaH_2PO_4$, pH 7.0) y 300 µL de 0.05% 3-trimethylsilyl-2,2,3,3-d4-propionate (TSP) en agua deuterada ($D_2O$), el cual se usó como estándar de desplazamiento químico (Dona *et al*., 2016). La mezcla fue transferida a un tubo NMR de 5 mm previo al análisis de 1H-NMR.

### 2.3.5. Adquisición de espectros $^{1}$H-NMR y procesamiento

El análisis de resonancia magnética nuclear de Proton (1H-NMR) se llevó a cabo a 25°C en un equipo Varian 600 MHz AR Premium Compact equipment (Varian-Agilent, Santa Clara, California, U.S.), en un campo magnético de 14.1 T y una frecuencia de resonancia 1H de 599.77 Hz, usando una secuencia PRESAT con un tiempo de relajación de 2 s y un tiempo de adquisición de 3 s para alcanzar un total de 128 transientes (impulsos de energía de poca duración) y 64k puntos de datos recolectados. El espectro resultante fue escalonado manualmente y se corrigió la línea base usando el programa MNova (Mestrelab Research SL, Santiago de Compostela, Spain). Se aplicó una función Gaussiana con un factor de ampliación de línea de 0.3 Hz y la referencia se colocó en TSP (0.0). Después de apilar los espectros, se borró la región entre 4.6–4.8, correspondiente al agua residual con el fin de descartar los efectos de señales abundantes en el análisis multivariado. Los espectros fueron normalizados con base en la señal TSP (0.0) y divididos en bins de 0.04 ppm para obtener un total de 232 regiones.

### 2.3.6. Identificación de metabolitos y análisis multivariado

Para la identificación y cuantificación de metabolitos se empleó el servidor web Bayesil (Ravanbakhsh *et al*., 2015). Los datos obtenidos de los metabolitos fueron utilizados para el procesamiento estadístico e identificación de compuestos diferenciales usando los módulos del software MetaboAnalyst 5.0 (Puchades-Carrasco *et al*., 2016).

Los perfiles de 1H-NMR fueron exportados a formato .csv en Mnova. Se construyeron dos matrices de datos: la primera clasificando las muestras por su carga viral (variable Y) y la segunda clasificando las muestras de acuerdo a su sexo. Después de escalar los datos usando un algoritmo de Pareto, se realizó un Análisis Discriminante Ortogonal de Cuadrados Mínimos Parciales (OPLS-DA). La calidad del modelo fue descrita por los porcentajes de variación del conjunto explicado por los componentes Y (R2) y los modelos de acuerdo a la validación cruzada (Q2). Las características influyentes sobre el modelo OPLS-DA fueron detectadas usando la gráfica de importancia de variables (FIP) (Wiklund *et al*., 2008). La puntuación de la importancia de las variables en la proyección (VIP scores) se usó para

evaluar las principales señales influenciadas por la separación entre variables. La identificación de metabolitos se llevó a cabo usando el software Chenomx NMR suite (v. 8.3, evaluation version, Chenomx Inc., Edmonton, AB, Canada). Finalmente, se probó la significancia estadística usando una prueba de T con un valor de $p < 0.05$.

## 2.4. Resultados

### 2.4.1. *P. argus* clínicamente infectados y no infectados

Inicialmente, el estatus de salud de las langostas se determinó en campo basado en la presencia o ausencia de los signos clínicos de la infección (*e.g*, hemolinfa lechosa que no coagula y coloración rojiza externa) (Shields y Behringer, 2004). Sin embargo, después de llevar a cabo la reacción de qPCR, las muestras se categorizaron en langostas clinicamente infectadas (CIL, $>1x10^6$ viral copies·$\mu L^{-1}$ of gDNA) y langostas no infectadas clínicamente (NIL, $< 1x10^3$ viral copies·$\mu L^{-1}$ of gDNA). De las 17 langostas usadas en el estudio, ocho (cuatro machos y cuatro hembras) fueron catalogadas dentro del grupo CIL y nueve (tres machos y seis hembras) fueron catalogadas como NIL. En el grupo CIL, los machos tenían una longitud de cefalorotax (LC) de 34.75 ± 4.85 mm (promedio ± SD) y las hembras tenían una LC de 31.75 ± 2.06 mm. Las cargas virales cuantificadas por qPCR fueron de 128 ± 97. $25×10^6$ (promedio ± SD) copias virales·$ng^{-1}$ gDNA para machos y de 131.25 ± $101.26×10^6$ para hembras. En el grupo NIL, el tamaño promedio de los machos fue de 36.33 ± 6.42 mm LC y el tamaño promedio de las hembras fue de 34.5 ± 7.05 mm LC. La carga viral promedio fue de 18.7 ± $2.58×10^2$ copias virales·$ng^{-1}$ de gDNA para machos y 6.03 ± $2.15×10^2$ para hembras.

### 2.4.2. Diferencias en los metabolitos entre grupos experimentales

En general, el análisis de 1H-NMR (CIL Y NIL) de la glándula antenal de ambos grupos permitió identificar un perfil de metabolitos que consistió en un total de 48 compuestos que incluían categorías de metabolitos como azúcares, compuestos organosulfurados, alcoholes, azúcares alcohólicos, ácidos orgánicos y aminoácidos (AA) (Cuadro 3). De acuerdo a los valores del gráfico OPLS-DA y el espectro de 1H-NMR, se pudo observar una

separación clara entre los grupos CIL y NIL (Figura 9A y 10). De acuerdo al gráfico de importancia de variables (Figura 9C) y prueba de T ($p < 0.05$), hubo una disminución en los niveles de isoleucina (δ 3.66, δ 1.46, δ 1.02, δ 0.94), leucina (δ 3.74, δ 1.74, δ 1.70, δ 1.66, δ 0.98, δ 0.94), threonina (δ 3.58, δ 1.34), lisina (δ 3.74, δ 3.02, δ 1.94, δ 1.90, δ 1.70, δ 1.50), metionina (δ 3.86, δ 2.14, δ 2.10), arginina (δ 3.74, δ 3.22, δ 1.90, δ 1.70), tirosina (δ 3.02), valina (δ 1.02, δ 0.98), alanina (δ 3.78, δ 1.50), carnitina (δ 3.42, δ 3.22), ornitina (δ 3.78, δ 1.94, δ 1.74), betaína (δ 3.90, δ 3.26) y glicina (δ 3.54) en el grupo CIL (Cuadro 4). También se encontraron metabolitos no identificados con señales de δ 4.78, δ 9.51, δ6.63, δ 5.95, δ 6.59, δ8.67, δ5.91, δ6.67, δ7.63, δ4.82, δ5.67, δ9.47, δ6.03 y δ2.74, los cuales se encontraban en abundancia en el grupo CIL.

Cuadro 3. Lista de compuestos identificados por H1-NMR.

| HMDB ID | Compound Name | HMDB ID | Compound Name |
|---|---|---|---|
| - | TSP | HMDB00172 | Isoleucina |
| HMDB00001 | 1-Metilhistidina | HMDB00177 | L-Histidina |
| HMDB00008 | Ácido 2-Hidroxibutirico | HMDB00182 | L-Lisina |
| HMDB00042 | Ácido acético | HMDB00187 | L-Serina |
| HMDB00043 | Betaina | HMDB00190 | L-Ácido Láctico |
| HMDB00060 | Acetoacetata | HMDB00191 | Aspartato |
| HMDB00062 | Carnitina | HMDB00214 | L-Ornitina |
| HMDB00064 | Creatina | HMDB00243 | Ácido Pirúvico |
| HMDB00094 | Ácido cítrico | HMDB00254 | Succinato |
| HMDB00097 | Colina | HMDB00294 | Urea |
| HMDB00108 | Etanol | HMDB00357 | Ácido 3-Hidroxibutirico |
| HMDB00122 | D-Glucosa | HMDB00517 | L-Arginina |
| HMDB00123 | Glicina | HMDB00562 | Creatinina |
| HMDB00131 | Glicerol | HMDB00641 | L-Glutamina |
| HMDB00142 | Formato | HMDB00687 | L-Leucina |
| HMDB00148 | Ácido L-Glutámico | HMDB00691 | Malonato |
| HMDB00157 | Hipoxantina | HMDB00696 | Methionina |
| HMDB00158 | Tirosina | HMDB00863 | Alcohol Isopropílico |
| HMDB00159 | L-Fenilalanina | HMDB00883 | Valina |
| HMDB00161 | L-Alanina | HMDB00929 | Triptofano |
| HMDB00162 | L-Prolina | HMDB01659 | Acetona |
| HMDB00167 | L-Treonina | HMDB01873 | Ácido Isobutírico |
| HMDB00168 | L-Asparagina | HMDB01875 | Metanol |
| HMDB04983 | Dimetil sulfona | HMDB01881 | Propilenglicol |

Cuadro 4. Metabolitos alterados identificados en la comparación de los grupos CIL y NIL.

| HMDB ID | Nombre | Cambio químico | Categoría bioquímica | VIP score | Log2FC | Valor p | Valor p-ajustado |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| HMDB00043 | Betaina | δ 3.90, δ 3.26 | NPAA | 1.00 | -1.01 | 0.0062028 | 0.01379 |
| HMDB00062 | Carnitina | δ 3.42, δ 3.22 | AAD | 0.68 | -0.55 | 0.018734 | 0.033 |
| HMDB00123 | Glicina | δ 3.54 | NEAA | 0.72 | -0.61 | 0.039806 | 0.0051 |
| HMDB00158 | Tirosina | δ 3.02 | NEAA | 1.33 | -1.02 | 0.00011695 | 0.00059135 |
| HMDB00161 | L-Alanina | δ 3.78, δ 1.50 | NEAA | 1.19 | -0.93 | 0.00170312 | 0.004704405 |
| HMDB00167 | L-Treonina | δ 3.58, δ 1.34 | EAA | 0.83 | -0.75 | 0.001849 | 0.0054101 |
| HMDB00172 | Isoleucina | δ 3.66, δ 1.46, δ 1.02, δ 0.94 | EAA | 1.34 | -1.09 | 0.00312366 | 0.006028776 |
| HMDB00182 | L-Lisina | δ 3.74, δ 3.02, δ 1.94, δ 1.90, δ 1.70, δ 1.50 | EAA | 1.38 | -0.94 | 0.00032346 | 0.001072317 |
| HMDB00214 | L-Ornitina | δ 3.78, δ 1.94, δ 1.74 | NPAA | 1.27 | -0.98 | 1.14 | 0.003233227 |
| HMDB00517 | L-Arginina | δ 3.74, δ 3.22, δ 1.90, δ 1.70 | EAA | 1.17 | -1.17 | 0.00057371 | 0.001731373 |
| HMDB00687 | L-Leucina | δ 3.74, δ 1.74, δ 1.70, δ 1.66, δ 0.98, δ 0.94 | EAA | 1.02 | -1.49 | 0.00024881 | 0.000776661 |
| HMDB00696 | Metionina | δ 3.86, δ 2.14, δ 2.10 | EAA | 1.11 | -1.21 | 0.00286742 | 0.00657624 |
| HMDB00883 | Valina | δ 1.02, δ 0.98 | EAA | 1.23 | -1.62 | 2.08E-06 | 4.10E-05 |
| HMDB0000190 | Lactato | δ 1.34 | OA | 1.12 | -0.75 | 0.001849 | 0.0054101 |

NPAA: Non-Proteinogenic Amino Acid, AAD: Amino Acid Derivate, NEAA: Non-essencial Amino Acid, EAA: Essencial Amino Acid, OA: Organic acid

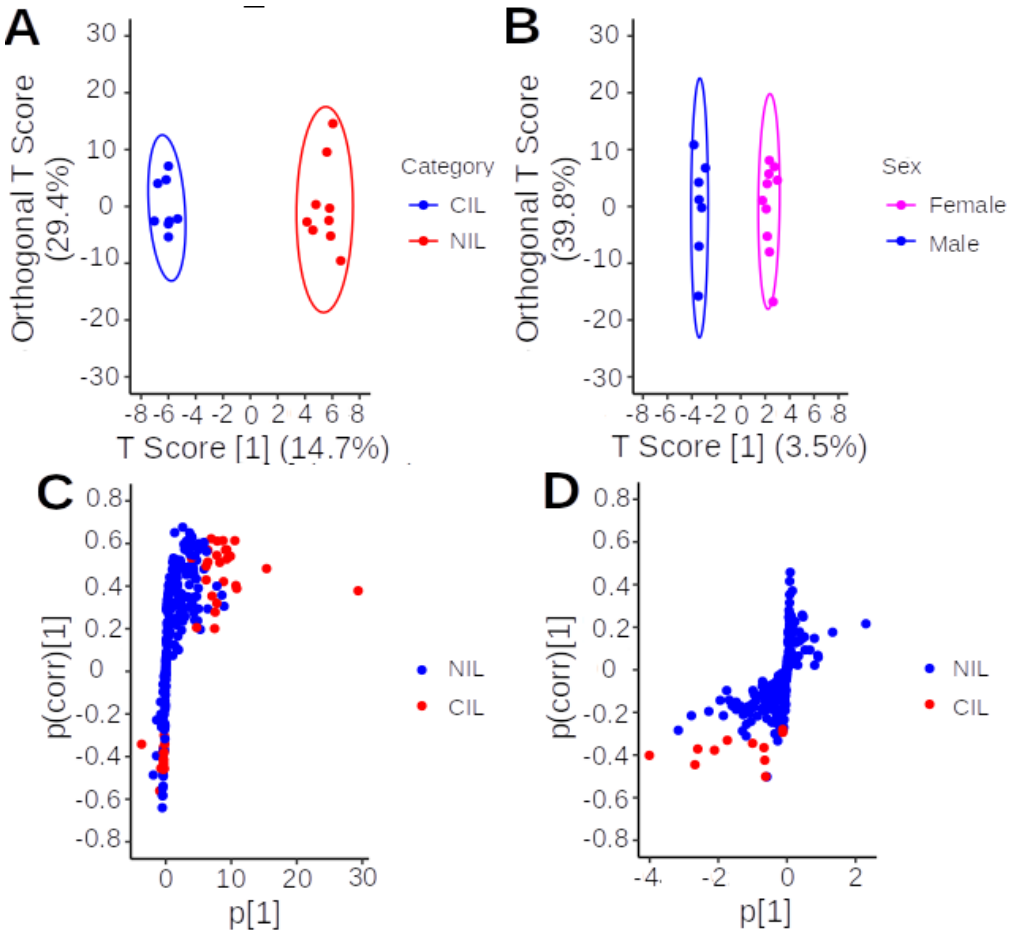


Figura 10. Perfil metabólico del extracto acuoso de la glándula antenal de Panulirus argus. El gráfico OPLS fue analizado con base en A) la carga viral (NIL vs CIL) y B) el sexo de las langostas.

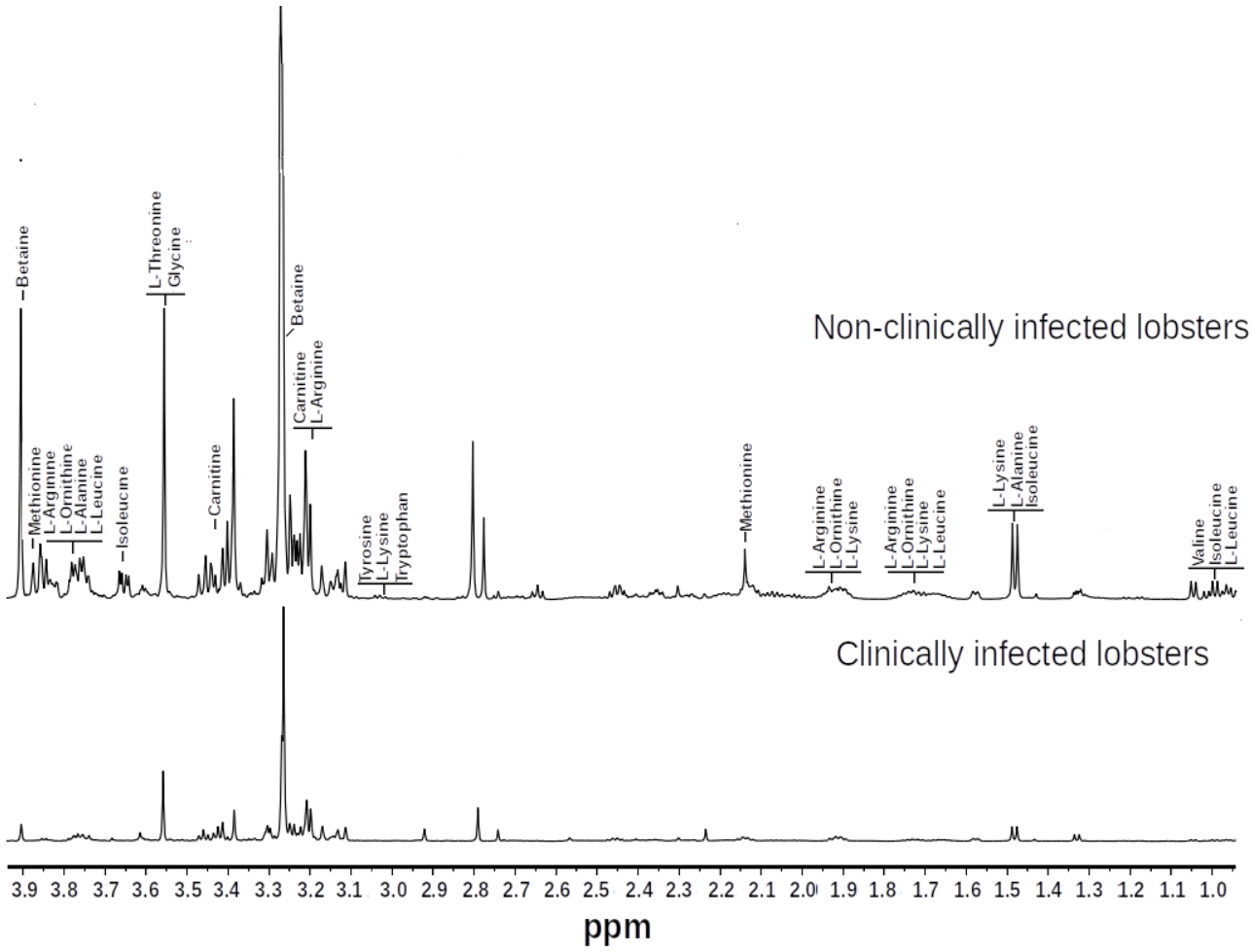


Figura 11. Espectro 1H-NMR de los compuestos diferenciales comparando los grupos CIL (Clinically infected lobsters) vs NIL (Non-clinically infected lobsters) de P. argus.

### 2.4.3. Diferencias en los metabolitos entre sexos

Los perfiles metabólicos fueron similares entre machos y hembras de acuerdo a lo observado en los valores del OPLS-DA (Figura 9B) y el agrupamiento de las muestras estuvo influenciado por pocas señales con diferencias significativas ($p < 0.05$) que correspondían a compuestos sin identificar (Figura 9D). Por ejemplo, se encontraron en abundancia metabolitos no identificados con señales δ 9.23, δ 8.79, δ 8.23, δ 6.11, δ 5.63, δ 5.43, δ 5.27, δ 3.70, δ 3.50, δ 2.94, δ 2.74, δ 1.82, δ 1.34, δ 0.5 en machos, mientras que metabolitos no identificados con señales en δ 9.59 y δ 9.75 fueron detectados en altos niveles en hembras.

## 2.5. Discusión

Tras dos décadas del descubrimiento del PaV1, se han realizado muchos trabajos respecto a su taxonomía, forma de transmisión y efectos sobre el estado de salud de su hospedero que han resultado útiles para ponderar su potencial impacto negativo sobre las poblaciones de la langosta espinosa del Caribe (Shields y Behringer, 2004; Lozano-Álvarez *et al*., 2008; Huchin-Mian *et al*., 2008; Behringer *et al*., 2008). Por ejemplo, se tiene evidencia de que la liberación de las partículas virales a través de la orina y la hemolinfa puede estar relacionada al comportamiento de evitación en las langostas espinosas (Behringer *et al*., 2010; Ross *et al*., 2019). En este estudio, se llevó a cabo la evaluación comparativa del efecto metabolómico del PaV1 en la glándula antenal de langostas juveniles silvestres para evaluar los efectos de esta enfermedad sobre el hospedero en un órgano vital para la secreción de desechos metabólicos y partículas esenciales para la comunicación intraespecífica y el mantenimiento de la osmorregulación del organismo.

El grupo CIL evaluado en este trabajo presentó altas cargas virales similares a las reportadas previamente para langostas juveniles con estados avanzados de la infección y colectadas en la Laguna Arrecifal de Puerto Morelos (Zamora-Briseño *et al*., 2020 a,b), mientras que las langostas del grupo NIL presentaron cargas virales por debajo de las $< 1x10^3$ copias virales·$\mu L^{-1}$. Las langostas de este grupo no tenían signos clínicos de la infección (*i.e*., hemolinfa lechosa que no coagula y exoesqueleto rojizo).

En este análisis, todos los metabolitos identificados estuvieron disminuidos en el grupo CIL. Uno de estos metabolitos es el lactato. El lactato es el producto final del metabolismo anaeróbico y depende fuertemente de los niveles de glicógeno. Niveles altos de lactato son comunes en los animales durante actividades energéticamente demandantes como la búsqueda de comida y pareja (Omlin y Weber, 2010; Lee *et al*., 2015). Durante los últimos estadios de la infección por PaV1, el consumo de alimentos disminuye en las langostas que muestran letargia (Li et al., 2008), y estos periodos de estrés metabólico pueden disminuir los niveles de glicógeno disponibles para la conversión a lactato (Herrera-Salvatierra *et al*., 2019), lo cual explicaría el agotamiento del lactato en el grupo CIL.

También se observó un severo desbalance en el contenido de aminoácidos (AA). En total se detectaron 11 AA disminuidos, siete de los cuales fueron aminoácidos esenciales (EAA), los deben ser obtenidos a través de la alimentación. Esto es importante debido a que los AA son las estructuras básicas de las proteínas y son indispensables para todos los procesos metabólicos del organismo, incluyendo la autopreservación, crecimiento, síntesis hormonal, nutrición y funcionamiento del sistema inmune. Muchas condiciones pueden causar un desbalance en el contenido de AA libres. Estas razones pueden incluir la posible manipulación del metabolismo del hospedero por parte del patógeno lo cual ha sido reportado en otras infecciones virales (Ren *et al*., 2018). Otra razón podría ser la alteración en el aporte nutricional debido a un funcionamiento defectuoso del sistema digestivo (Barker y Gibson, 1977). El PaV1 afecta fuertemente la integridad estructural del hepatopáncreas e impacta negativamente en la función digestiva así como en la absorción de nutrientes (Shields y Behringer, 2004; Li *et al*., 2008). Adicionalmente, algunos EAA como arginina (Arg), asparagina (Asp), lisina (Lis) y triptófano (Trp), están involucrados en funciones inmunes en muchos animales (Ren *et al*., 2018; Huang *et al*., 2020). Esto también ocurre con otros AA como glicina o tirosina (Tir), pues participan en actividades del sistema inmune en crustáceos a pesar de ser considerados como no esenciales (NEAA) (Zhong *et al*., 2003; Li *et al*., 2005).

En los mamíferos, la isoleucina (Ile) influye en la activación de los receptores acoplados a proteínas G y las rutas de señalización ERK, induciendo la expresión de péptidos antimicrobianos involucrados en la inmunidad en los intestinos (Konno *et al*., 2012, Mineshiba *et al*., 2003; DaCILn y Ulanova, 2013). Una disminución en la producción de péptidos antimicrobianos puede cambiar la interacción entre la microbiota intestinal y el hospedero (Ostaff *et al*., 2013; Zong *et al*., 2020). En *P. argus*, existe evidencia de que el PaV1 causa un desbalance en la microbiota intestinal de langostas infectadas (Zamora-Briseño *et al*., 2020a). Por tanto, la reducción en el contenido de estos AA podría reflejar la falta de respuesta del sistema inmune debido al agotamiento metabólico de las langostas infectadas. Sin embargo, esta posibilidad requiere una validación experimental.

El triptófano (Trp) es un aminoácido clave para un sinnúmero de procesos fisiológicos, incluyendo funciones relacionadas a la regulación hormonal e inmune. Por ejemplo, el Trp

puede ser hidroxilado en 5-hidroxitriptófano, el cual a la vez es descarboxilado en serotonina (Ser), un importante neurotransmisor, y posteriormente a melatonina, una hormona involucrada en el sistema inmune, la regulación del ciclo circadiano y la defensa antioxidante (Geihs *et al*., 2010; Yao *et al*., 2011; Sainath *et al*., 2013; Cryan *et al*., 2019). Se ha sugerido que las enzimas involucradas en el metabolismo de neuromoduladores en el hepatopáncreas de langostas infectadas pueden estar asociadas con una desregulación del contenido de aminoácidos aromáticos libres (Zamora-Briseño *et al*., 2020b). Por ejemplo, en hepatopáncreas se reportó la desregulación en los niveles de la enzima sepiapterina reductasa (SPR), que cataliza las reacciones reductoras en la biosíntesis de tetra-hidrobiopterina (BH4), un cofactor clave para las hidroxilasas de aminoácidos aromáticos dependientes de biopterina; también se encontraron desregulados los niveles de fenilalanina hidroxilasa (PH), tirosina hidroxilasa (TH) y triptófano hidroxilasa (TrH), las cuales son responsables de la síntesis de tirosina, serotonina, L-DOPA, melatonina y catecolaminas (Kaufman, 1993; Caccamo *et al*., 2013). Lo anterior es importante, pues una disminución de la SPR puede resultar en un desbalance en los niveles de AA y sus hidroxilasas, que a la vez comprometen la síntesis de compuestos hormonales. Adicionalmente, L-DOPA es convertida en catecolaminas como dopamina, norepinefrina y epinefrina (Daubner *et al*., 2011). Cabe mencionar que la dopamina suprime la respuesta inmune e incrementa la susceptibilidad de contraer infecciones bacterianas oportunistas en camarones y cangrejos (Li *et al*., 2005; Mapanao *et al*., 2018). Por tanto, la disminución de dopamina debido a una disminución de Tyr podría tener un impacto positivo en la respuesta contra patógenos. Sin embargo, la reducción en el contenido de catecolaminas también podría promover la letargia y un comportamiento de escape reducido, signos observados en langostas con signos clínicos de la infección (Behringer *et al*., 2008, Zamora-Briseño *et al*., 2020b).

A pesar de que algunos aminoácidos no esenciales (NEAA) pueden ser sintetizados a partir de otros AA, sus funciones están lejos de ser irrelevantes. Por ejemplo, el NEAA Arginina (Arg) se puede sintetizar a partir de la prolina, ácido glutámico o glutamina y se puede usar para producir urea, poliaminas, óxido nítrico (NO), creatina y otros compuestos no proteicos esenciales (Wu *et al*., 2009). Por sí sola, la Arg regula la actividad enzimática de la aspartato aminotransferasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT), dos indicadores clave de la función hepatopancreática en crustáceos (Jin *et al*., 2016). Además, la Arg desempeña un papel importante en el metabolismo energético, ya que uno de sus derivados, la fosfato

arginina, representa una de las mayores moléculas de reserva energética en invertebrados (Jiménez y Kinsey, 2015). Este AA también supone una fuente importante de energía para la replicación viral (Becker *et al*., 1967; Grimes *et al*., 2021), por lo que una disminución en sus niveles podría ser explicada por el aumento de la carga viral en los estados avanzados de la infección (Li *et al*., 2008a) y por la consecuente anorexia, lo cual disminuye paulatinamente el aporte nutrimental necesario para mantener las reservas energéticas (Pascual-Jiménez *et al*., 2012; Herrera-Salvatierra *et al*., 2019).

Los niveles de treonina (Thr) disminuyeron en el grupo CIL. Thr es uno de los EAAs que modulan la biosíntesis de glicina (Gly) (Xie *et al*., 2014), por lo que podría estar implicada en la reducción de los niveles de Gly debido a la inanición en los estados avanzados de la infección por PaV1. Como en muchos otros organismos, Gly es el aminoácido libre más abundante en los crustáceos (D'Aniello, 1980; Roseth y Fonnum, 1995). La Gly es sintetizada a partir de la colina, serina, hidroxiprolina o treonina (Wang *et al*., 2013a). Este aminoácido es un importante neurotransmisor inhibitorio, así como un nutriente antiinflamatorio, inmunomodulador y citoprotector que participa en la síntesis de purinas, porfirinas, creatina y glutation (Roseth y Fonnum, 1995; Zhong *et al*., 2003). En crustáceos, la suplementación alimentaria con Gly es útil para incrementar el desempeño físico debido a su rol en las respuestas osmorreguladoras en animales acuáticos ante una condición estresante proveniente del exterior (Wang *et al*., 2013a; Xie *et al*., 2014).

Una disminución de Gly también es un factor limitante para la síntesis del colágeno, el cual depende de la disponibilidad de altos niveles de Gly, Lys y Pro (de Paz-Lugo *et al*., 2018). El colágeno es un componente de los tejidos conectivos, esencial para la diferenciación y mantenimiento estructural celular (Babu, 1987; Sivakumar *et al*., 2000), los cuales resultan dañados durante los estados finales de la infección por PaV1 (Li *et al*., 2008a).

En el grupo CIL también se detectó una acumulación diferencial de varios AA no proteicos como L-carnitina, ornitina o betaína. La carnitina es sintetizada a partir de Lys y Met, pero también puede ser obtenida de fuentes alimenticias (Adeva-Andany *et al*., 2017). La L-carnitina juega un papel central en el metabolismo energético y de lípidos debido a que está involucrada en la transferencia de ácidos grasos de cadena larga desde el citoplasma hasta la mitocondria

para ser usados en la beta-oxidación, en donde los ácidos grasos son convertidos en Acyl-CoA y son integrados al ciclo de Krebs (Novakova *et al*., 2016; Almannai *et al*., 2019). Debido a que la L-carnitina es obtenida a partir de los EAAs Lys y Met, es probable que la anorexia mostrada por las langostas en estados avanzados de la infección por PaV1 contribuya a su disminución e impacte negativamente en el metabolismo energético de los lípidos (Pascual-Jiménez *et al*., 2012; Herrera-Salvatierra *et al*., 2019; Zamora-Briseño *et al*., 2020a).

La ornitina (Orn) es otro AA no proteico que en conjunto con Arg es un componente central del ciclo de la urea. Debido a que Arg actúa como precursor de Orn, la reducción en los niveles de Arg puede explicar la reducción en el contenido de Orn. Además, niveles bajos de Orn y Arg se encuentran asociados con niveles altos de amonio en el plasma (participan en el ciclo de la urea en donde se excreta nitrógeno en forma de urea), pero también con una deficiencia proteica y desnutrición (Zieve, 1986). Las langostas pueden eliminar el nitrógeno en forma de urea y amonio (Zoutendyk, 1987); entonces, una reducción en la actividad del ciclo de la urea puede reducir la eliminación de productos nitrogenados. Las langostas excretan nitrógeno en forma de amonio principalmente a través de las branquias (Battison, 2013). Por tanto, el daño en las branquias observado en las langostas en estados avanzados de la infección por PaV1 (Li *et al*., 2008a), junto con la reducción de Orn puede comprometer el proceso de excreción de amonio. Además, la Orn es fundamental para la síntesis de poliaminas como putrescinas, esperminas y espermidinas, las cuales son metabolitos importantes para procesos celulares básicos como el crecimiento y proliferación celular (Lefèvre *et al*., 2011; Ramani *et al*., 2014). Las poliaminas también son esenciales para la regulación de los procesos de fosforilación/defosforilación de la enzima Na+ K+ ATPasa, la cual controla en gran medida los procesos osmoregulatorios (Silva *et al*., 2008; Lucena *et al*., 2017). En las langostas, las poliaminas actúan como poderosos estimulantes olfativos ya que muestran preferencia por alimentos ricos en nitrógeno (Zimmer-Faust y Case, 1982). Por tanto, la evaluación de estos compuestos derivados de Orn pueden proveer de pistas acerca del comportamiento de evitación mostrado por las langostas sanas hacia las langostas infectadas, una hipótesis que requiere un proceso de corroboración experimental más detallado.

La betaína (GB) es una molécula orgánica soluble en agua que actúa como un importante osmorregulador que se acumula en el citoplasma en respuesta al estrés osmótico. Esta

molécula tiene la habilidad de retener agua debido a su capacidad de unión a moléculas de agua. Además, bajo condiciones de estrés por salinidad, los grupos cargados de GB se asocian con iones inorgánicos para estabilizar las proteínas (Fedotova y Kruchinin, 2017). Investigaciones anteriores han demostrado una acumulación de GB durante la infección por WSSV en el camarón blanco (*Penaeus vannamei*) y langostas de agua dulce (*Cherax quadricarinatus*) debido a la regulación positiva de la betaína aldehído deshidrogenasa (Fan *et al*., 2016; Soñanez-Organis *et al*., 2019). En contraste, en este trabajo se encontró una disminución en los niveles de GB, lo que puede contribuir al desequilibrio osmótico y es consistente con los datos sobre cambios en la presión osmótica observado previamente en langostas juveniles infectadas con PaV1 (Pascual-Jiménez *et al*., 2012). La GB es también un estimulante gustativo en el medio marino (Carr y Chaney, 1976).

Las concentraciones de algunos metabolitos no identificados fueron diferentes entre machos y hembras. Se han observado algunas diferencias en el cangrejo fantasma *Ocypode platytarsis*, donde los AA Gly, Val y Met sólo se detectaron en el tejido muscular de los machos y las concentraciones de Glu y Thr fueron mayores en la hemolinfa de los machos que en la de las hembras (Sankar y Yogamoorthi, 2012). Asimismo, en la langosta espinosa japonesa, *Panulirus japonicus*, la concentración de Gly fue mayor, pero la de Pro y ADP fue menor en los machos que en las hembras (Cruz y Phillips, 2000). A partir de estas observaciones preliminares, se sugiere la necesidad de realizar más estudios para mejorar nuestra comprensión de las diferencias en las respuestas metabólicas de machos y hembras de *P. argus* frente a PaV1, ya que la señal diferencial detectada corresponde a compuestos que no fueron identificados.

## 2.6. Conclusión

Este trabajo constituye la primera evaluación metabolómica de la glándula antenal de *P. argus* juveniles silvestres infectados con PaV1. Esos datos mostraron diferencias metabólicas entre los grupos CIL y NIL, así como entre sexos. Se encontraron alteraciones substanciales en el contenido de EAA y NEAA en etapas avanzadas de la enfermedad. Con base en estos resultados y en estudios previos, se considera que la disminución de AA se debió principalmente a la anorexia y desórdenes digestivos. Otros productos metabólicos alterados

estaban relacionados con la osmorregulación, gluconeogénesis y el ciclo de la urea. Se recomiendan evaluaciones más profundas sobre las consecuencias potenciales de la disminución en el metabolismo del nitrógeno y el desbalance de aminoácidos proteicos y no proteicos descritos en este trabajo.

Los resultados de este capítulo fueron publicados en:

Hernández-Velázquez, I. M., Zamora-Briseño, J. A., Hernández-Bolio, G. I., Hernández-Nuñez, E., Lozano-Álvarez, E., Briones-Fourzán, P., & Rodríguez-Canul, R. (2022). Metabolic changes in antennal glands of Caribbean spiny lobsters *Panulirus argus* infected by Panulirus argus virus 1 (PaV1). *Diseases of Aquatic Organisms, 151,* 11-22. https://doi.org/10.3354/dao03682

# CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN GENERALES

## 3.1. Discusión general

PaV1 ejerce un impacto negativo en su hospedero, incluyendo la destrucción celular de los órganos afectados, lo que lleva a una disfunción metabólica substancial que eventualmente resulta en la muerte del organismo infectado (Li *et al*., 2008; Pascual-Jiménez *et al*., 2012; Herrera-Salvatierra *et al*., 2019; Zamora-Briseño *et al*., 2020a; Zamora-Briseño *et al*., 2020b). En este estudio, se llevó a cabo la evaluación transcriptómica y metabolómica comparativa del efecto del PaV1 sobre órganos vitales en langostas del Caribe juveniles silvestres para evaluar los efectos de esta enfermedad sobre el hospedero. Para ello fueron escogidos el intestino y las glándulas antenales, órganos esenciales para la nutrición, el mantenimiento de la osmorregulación y la secreción de desechos metabólicos, entre otras funciones.

### 3.1.1. Desregulación de la expresión génica y su efecto en el metabolismo

El PaV1, como otras enfermedades virales, genera una desregulación de la expresión génica en las células infectadas. En este sentido, la sobre-expresión de factores de transcripción (FT) como los factores Krüppel-like factors (KLFs) encontrados en este trabajo pueden esclarecer el origen de estas afectaciones. Los genes KLFs pertenecen a una familia de FTs filogenéticamente conservados responsable del reclutamiento de cofactores transcripcionales que controlan la expresión de genes involucrados en el metabolismo y otros procesos celulares

(Schuh *et al*., 1986; Groenendijk *et al*., 2004; Feinberg *et al*., 2007; Zahlten *et al*., 2013). Además, los KLFs afectan el metabolismo de carbohidratos, lípidos y aminoácidos, ya que entre sus funciones se encuentra la de controlar el mantenimiento de las células madre intestinales, regulando así la adquisición de nutrientes (Hsieh *et al*., 2019). En crustáceos ciertos KLFs también se han asociado con la regulación del sistema inmune (Chang *et al.*, 2012; Yang *et al*., 2020). A pesar de que la sobre-expresión de los KLFs podría estar indicando que la capacidad intestinal de absorción de nutrientes y los genes inmunes regulados por el mismo no ha sido afectada, el estado de inanición crónico que desarrollan las langostas infectadas podría afectar la concentración de aminoácidos esenciales y los genes del sistema inmunes que no son regulados por este sistema.

El PaV1 es capaz de generar una destrucción celular y un desbalance metabólico generalizado como consecuencia de un proceso que comienza con la desregulación de la expresión génica en las células infectadas. A la vez, este proceso se retroalimenta a través de los desbalances metabólicos graves puesto que esta infección viral tiene la capacidad de desregular otras funciones dentro del hospedero. La disminución en los niveles de algunos aminoácidos encontrados en la glándula antenal puede reflejar la existencia de desbalances a nivel molecular como aquellos encontrados en el intestino, de la misma forma que algunos aminoácidos están involucrados en el correcto funcionamiento de otros órganos. Tal es el caso de la isoleucina (Ile), ya que esta influye en la inducción de la expresión de péptidos antimicrobianos involucrados en la inmunidad en los intestinos (Konno *et al*., 2012; Mineshiba *et al*., 2003; DaCILn y Ulanova, 2013). Una disminución en la producción de péptidos antimicrobianos puede cambiar la interacción entre la microbiota intestinal y el hospedero (Ostaff *et al*., 2013; Zong *et al*., 2020) y tal como se ha reportado previamente, en *P. argus* existe evidencia de que el PaV1 causa un desbalance en la microbiota intestinal asociada a langostas infectadas (Zamora-Briseño *et al*., 2020a). Por tanto, la reducción en el contenido de estos AA en la glándula antenal podría afectar el correcto funcionamiento del intestino y a la vez reflejar la falta de respuesta del sistema inmune debido al agotamiento metabólico de las langostas infectadas. Sin embargo, esta posibilidad requiere una validación experimental.

### 3.1.2. Transporte de iones y osmorregulación: funciones compartidas

Al igual que la glándula antenal, el epitelio intestinal de los crustáceos está involucrado en el transporte de iones, además de ejercer funciones de excreción, que son importantes para la osmorregulación y la absorción de nutrientes (Chung y Lin, 2006). En este sentido, es probable que la sub-expresión de las subunidades α y β de la ATPasa sodio/ potasio ($Na^+/K^+$-ATPasa) del intestino, así como de los metabolitos betaína y ornitina en la glándula antenal, tengan la posibilidad de afectar esta función. La enzima $Na^+/K^+$-ATPasa participa en el transporte de iones $Na^+$ y $K^+$ a través de la membrana celular, así como en la transducción de señales, las especies reactivas de oxígeno, el volumen celular y el transporte de calcio (Clausen *et al*., 2017). A la vez, los procesos de esta enzima son regulados negativamente por las poliaminas - las cuales tienen su origen en la ornitina- y la betaína (Silva *et al*., 2008; Garçon et al., 2011 Lucena *et al*., 2017). Dado que los transcritos que codifican a la enzima $Na^+/K^+$-ATPasa se encuentran reducidos y tanto la ornitina como la betaína tienen la capacidad de disminuir la actividad de esta enzima, las afectaciones del PaV1 sobre el sistema osmorregulador y el metabolismo energético pueden ser importantes. Cabe mencionar que la betaína también posee una actividad reguladora hacia la enzima citocromo c oxidasa (COX), la última enzima dentro de la cadena de transporte de electrones (ETC), un mecanismo vital para llevar a cabo la respiración celular y la producción de ATP (Lee, 2021). Adicionalmente, la ETC se encontró afectada por la disminución en los transcritos de la subunidad 1 de la flavoproteína succinato deshidrogenasa (SDHA) la cual también forma parte de la ETC. Además de esto, también fueron afectados por el PaV1 elementos clasificados dentro de la familia de transportadores ABC, que entre otras funciones son elementos reguladores de los procesos osmóticos (Rees et al., 2009).

### 3.1.3. Sistema inmune y replicación viral

Las infecciones virales inducen una amplia gama de mecanismos de defensa en el hospedero y a la vez, la función de las células inmunitarias depende en gran medida del funcionamiento metabólico del hospedero en un momento determinado (Moreno *et al*., 2019). Sin embargo, los virus también son capaces de hacer uso de estos mecanismos o cambiar su funcionamiento para su propio beneficio. Una de las funciones que se desarrollan en la célula y que controlan cada aspecto del funcionamiento biológico, incluyendo las funciones de defensa contra patógenos, es la regulación de la expresión génica y post-traduccional. Uno de los procesos

centrales en este sentido es el del esplicing alternativo, el cual es mediado por el complejo ribonucleico del espliceosoma y es capaz de determinar, entre otras cosas, la actividad enzimática, la estabilidad y las modificaciones post-transcripcionales de las proteínas (Stamm *et al*., 2005; Matera *et al*., 2014; Wang *et al*., 2015). En este trabajo se observó la sub-expresión de algunos transcritos relacionados con la regulación del espliceosoma (DDX5/DBP2, ASF/SF2 y hnRNP F/H). Además, se encontró aumentada la expresión del gen NFkB2, parte del complejo NfkB, un activador central de genes involucrados en funciones inflamatorias e inmunes (Tak y Firestein, 2001). Los componentes mencionados tienen la particularidad de ser elementos blanco para una gran cantidad de virus que buscan aumentar su capacidad de replicación, economizando los recursos genéticos a su alcance (Meyer, 2016). Irónicamente, aunque el complejo NfkB es activado por los virus y es uno de los mecanismos principales de defensa contra ellos, algunos de sus elementos también pueden ser controlados por los virus para evadir la respuesta antiviral (Zhao et al., 2015). Por tanto, la sobre-expresión del factor NfkB en etapas avanzadas de la infección por PaV1 puede deberse no sólo a la activación de genes de respuesta inmune contra el virus sino también a la acción del propio virus sobre este mecanismo. Este es un tópico que requiere investigaciones más profundas para elucidar el efecto del virus asociado a los mecanismos de defensa del hospedero.

Como parte de las afectaciones del PaV1 a su hospedero, la anorexia es la probable causa de la disminución de los aminoácidos encontrados en este trabajo. Sin embargo, las afectaciones de la disminución en los niveles de estos aminoácidos sobre el sistema inmune de *P. argus* deben ser consideradas debido a que los procesos inmunes en crustáceos son mediados en gran parte por la disponibilidad de aminoácidos, aunque los mecanismos por los que actúan no se comprenden por completo (Huang *et al.*, 2020).

## 3.2. Conclusión General

Este trabajo constituye la primera evaluación del transcriptoma del intestino y la primera evaluación metabolómica de la glándula antenal en juveniles silvestres de *P. argus* infectados con PaV1. Los resultados muestran diferencias transcriptómicas y metabólicas entre los grupos de langostas con signos clínicos de la enfermedad y sin signos clínicos de la

enfermedad, así como entre sexos. Los puntos destacados de esta investigación se resumen a continuación:

- Las mayores alteraciones encontradas a nivel molecular se encontraron en genes que codifican enzimas y genes asociados a procesos de generación energética, osmorregulación y sistema inmune.

- Se encontraron alteraciones a nivel metabólico, principalmente en el contenido de EAA y NEAA y de metabolitos reguladores de la osmorregulación.

- Con base en estudios previos, se considera que la disminución de AA se debió principalmente a la anorexia y desórdenes digestivos.

- Existe una alteración importante del metabolismo del nitrógeno, así como sobre los genes reguladores de la respuesta inmune y los procesos osmóticos.

Finalmente, esta tesis contribuye al entendimiento a nivel molecular del efecto del virus PaV1 en dos órganos clave para la homeostasis de la langosta espinosa. También se aporta conocimiento sobre metabolitos que pueden influir en el comportamiento social y gregario lo cual tiene relevancia ecológica ya que la langosta depende de sus habilidades sensoriales para distinguir entre congéneres, presas y depredadores e identificar refugios. De igual forma, la investigación a nivel transcriptómico del efecto de PaV1 sobre el intestino aporta al conocimiento sobre los posibles mecanismos de evasión que puede utilizar el virus para ingresar a la célula y por tanto nos ofrece alternativas de investigación con miras a una cura.

### 3.3. Perspectivas

Se recomienda realizar trabajos experimentales para corroborar los efectos de la disminución de metabolitos como betaína y ornitina sobre la osmorregulación, ya que la información es escasa en *P. argus*. También re recomienda la evaluación experimental sobre las posibles vías de entrada del virus del PaV1, especialmente aquellas involucradas en la respuesta inmune,

pues pueden ser claves para el futuro manejo de esta enfermedad. Estos datos tienen un valor adicional puesto que la langosta espinosa del Caribe aún no se puede cultivar debido a la complejidad de su ciclo de vida, pero al obtener información de aminoácidos esenciales y no esenciales asociados a machos y hembras en esta especie, se contribuye a que sea considerada para fines de acuacultura y potencial biotecnológico.

## BIBLIOGRAFÍA


Adeva-Andany, M. M., Calvo-Castro, I., Fernández-Fernández, C., Donapetry-García, C., and Pedre-Piñeiro, A. M. (2017). Significance of L-carnitine for human health. *IUBMB life*, 69(8), 578-594. https://doi.org/10.1002/iub.1646

Aggio, J., and Derby, C. D. (2011). Chemical communication in lobsters, in Breithaupt, T., Thiel, M. (Eds.), Chemical Communication in Crustaceans. Springer, New York, pp. 239–256. doi:10.1007/978-0-387-77101-4_12.

Almannai, M., Alfadhel, M., and El-Hattab, A. W. (2019). Carnitine inborn errors of metabolism. *Molecules*, 24(18), 3251. doi:10.3390/molecules24183251.

Andrews, S., Krueger, F., Seconds-Pichon, A., Biggins, F., Wingett, S. (2015). “FastQC. A quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Bioinformatics.” *Babraham Institute*. doi: citeulike-article-id:11583827.

Arnal, M. E., Lallés, J. P. (2016). Gut epithelial inducible heat-shock proteins and their modulation by diet and the microbiota. *Nutrition Reviews*, 74(3), 181-197.

Arnell, N. W., Livermore, M. J., Kovats, S., Levy, P. E., Nicholls, R., Parry, M. L., and Gaffin, S. R. (2004). Climate and socio-economic scenarios for global-scale climate change impacts assessments: characterising the SRES storylines. *Glob Environ Change*, 14(1), 3-20. https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2003.10.004

Atherley, N. A. M., Freeman, M. A., Dennis, M. M. (2020). Post-mortem examination of the Caribbean spiny lobster (*Panulirus argus*, Latreille 1804) and pathology in a fishery of the Lesser Antilles. *Journal of Invertebrate Pathology*, *175*, 107453.

Atherley, N. A., Dennis, M. M., Behringer, D. C., Freeman, M. A. (2021). Size at sexual maturity and seasonal reproductive activity of the Caribbean spiny lobster *Panulirus argus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, *671*, 129-145.

Ayllon, J., García-Sastre, A., Hale, B. G. (2012). Influenza A viruses and PI3K: are there time, place and manner restrictions? *Virulence*, 3(4), 411–414.

Babu, D. E. (1987). Histological and histochemical studies on regeneration and tissue differentiation in the crab *Menippe rumphii* (Fabricius) (Crustacea: Brachyura). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, *111*(3), 213-230. doi:10.1016/0022-0981(87)90029-3.

Barker, P. L., and Gibson, R. (1977). Observations on the feeding mechanism, structure of the gut, and digestive physiology of the European lobster *Homarus gammarus* (L.) (Decapoda: Nephropidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, *26*(3), 297-324. doi:10.1016/0022-0981(77)90089-2.

Battison, A. L. (2013). Subcuticular urate accumulation in an American lobster (*Homarus americanus*). *Vet . Pathol.*, *50*(3), 451-456. doi:10.1177/0300985812446148.

Bauer, R. T. (2010). Chemical communication in decapod shrimps: the influence of mating and social systems on the relative importance of olfactory and contact pheromones. In *Chemical Communication in Crustaceans* (pp. 277-296). Springer, New York, NY. doi:10.1007/978-0-387-77101-4_14.

Becker, Y., Olshevsky, U., and Levitt, J. (1967). The role of arginine in the replication of herpes simplex virus. *J. Gen. Virol.*, *1*(4), 471-478. doi:10.1099/0022-1317-1-4-471.

Behringer, D. C., Butler IV, M. J., Shields, J. D. (2008). Ecological and physiological effects of PaV1 infection on the Caribbean spiny lobster (*Panulirus argus* Latreille). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology,* 359(1)*,* 26-33.

Behringer, D. C., Butler IV, M. J., Shields, J. D., Moss, J. (2011). Review of Panulirus argus virus 1—a decade after its discovery. *Dis. Aquat. Org.*, *94*(2), 153-160. doi:10.3354/dao02326.

Behringer, D. C., and Butler, M. J. (2010). Disease avoidance influences shelter use and predation in Caribbean spiny lobster. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, *64*(5), 747-755. doi:10.1007/s00265-009-0892-5.

Belov, G. A., and Ehrenfeld, E. (2007). Involvement of cellular membrane traffic proteins in poliovirus replication. *Cell Cycle*, *6*(1), 36-38.

Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser A Stat Soc.*, 57(1), 289-300.

Berry, F. C., and Breithaupt, T. (2010). To signal or not to signal? Chemical communication by urine-borne signals mirrors sexual conflict in crayfish. *BMC Biol.*, *8*(1), 1-11. doi:10.1186/1741-7007-8-25.

Bolger, A. M., Lohse, M., Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.

Bolhassani, A., Agi, E. (2019). Heat shock proteins in infection. *Clinica Chimica Acta*, 498, 90-100.

Bradshaw, R. A., Dennis, E. A. (Eds.). (2009). Handbook of cell signaling. *Academic Press*. ISBN 9780123741455.

Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat. Biotechnol.*, 34(5), 525-527.

Briones-Fourzán, P., de Lara, V. C. F., Lozano-Álvarez, E., and Estrada-Olivo, J. (2003). Feeding ecology of the three juvenile phases of the spiny lobster *Panulirus argus* in a tropical reef lagoon. *Mar. Biol.*, *142*(5), 855-865. doi:10.1007/s00227-003-1013-z.

Briones-Fourzán, P., Lozano-Álvarez, E., Negrete-Soto, F., and Barradas-Ortiz, C. (2007). Enhancement of juvenile Caribbean spiny lobsters: An evaluation of changes in multiple response variables with the addition of large artificial shelters. *Oecologia, 151,* 401–416. doi:10.1007/s00442-006-0595-9.

Butler, M. J., Behringer, D. C., Dolan, T. W., Moss, J., and Shields, J. D. (2015). Behavioral immunity suppresses an epizootic in Caribbean spiny lobsters. *PLoS One 10,* e0126374. doi:10.1371/journal.pone.0126374.

Butler, M. J., Behringer, D. C., and Shields, J. D. (2008). Transmission of Panulirus argus virus 1 (PaV1) and its effect on the survival of juvenile Caribbean spiny lobster. *Dis. Aquat. Org., 79,* 173–182. doi:10.3354/dao01899.

Caccamo, A., Magrì, A., Medina, D. X., Wisely, E. V., López-Aranda, M. F., Silva, A. J., Oddo, S. (2013). mTOR regulates tau phosphorylation and degradation: implications for Alzheimer's disease and other tauopathies. *Aging cell*, *12*(3), 370-380. doi:10.1111/acel.12057.

Camats, M., Guil, S., Kokolo, M., Bach-Elias, M. (2008). P68 RNA helicase (DDX5) alters

activity of cis-and trans-acting factors of the alternative splicing of H-Ras. *PLoS ONE*, *3*(8), e2926.

Candia-Zulbarán, R. I., Briones-Fourzán, P., Lozano-Álvarez, E. (2019). Confirming validity measures of visual assessment of PaV1 infection in Caribbean spiny lobsters. *Dis. Aquat. Org.*, 137(1), 47-51.

Candia-Zulbarán, R. I., Briones-Fourzán, P., Lozano-Álvarez, E., Barradas-Ortiz, C., and Negrete-Soto, F. (2015). Caribbean spiny lobsters equally avoid dead and clinically PaV1-infected conspecifics. *ICES J. Mar. Sci., 72,* i164–i169. doi:10.1093/icesjms/fsu249.

Carr, W. E., and Chaney, T. B. (1976). Chemical stimulation of feeding behavior in the pinfish, Lagodon rhomboides: characterization and identification of stimulatory substances extracted from shrimp. *Comp. Biochem. Physiol., Mol. Amp; Integr. Physiol.*, *54*(4), 437-441. doi:10.1016/0300-9629(76)90046-3.

Chaudhury, A., Chander, P., Howe, P. H. (2010). Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: Focus on hnRNP E1's multifunctional regulatory roles. *RNA*, 16(8), 1449-1462.

Chen, J. Y., Chen, W. N., Poon, K. M. V., Zheng, B. J., Lin, X., Wang, Y. X., Wen, Y. M. (2009). Interaction between SARS-CoV helicase and a multifunctional cellular protein (Ddx5) revealed by yeast and mammalian cell two-hybrid systems. *Archives of Virology*, 154(3), 507-512.

Chen, L., Hu, Y., He, J., Chen, J., Giesy, J. P., Xie, P. (2017). Responses of the proteome and metabolome in livers of zebrafish exposed chronically to environmentally relevant concentrations of microcystin-LR. *Environ. Sci. Technol.*, *51*(1), 596-607. doi:10.1021/acs.est.6b03990.

Chen, M., and Manley, J. L. (2009). Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nat. Rev. Mol.*, 10(11), 741-754.

Chung, K. F., Lin, H. C. (2006). Osmoregulation and Na, K-ATPase expression in osmoregulatory organs of *Scylla paramamosain*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 144(1), 48-57.

Clark, A. S., Behringer, D. C., Small, J. M., and Waltzek, T. B. (2018). Partial validation of a TaqMan real-time quantitative PCR assay for the detection of Panulirus argus virus 1. *Dis. Aquat. Org., 129,* 193–198. doi:10.3354/dao03242.

Clausen, M. V., Hilbers, F., Poulsen, H. (2017). The structure and function of the Na, K-ATPase isoforms in health and disease. *Front. Physiol.*, 8, 371.

Cochrane, K. L., and Chakalall, B. (2001). The spiny lobster fishery in the WECAFC region-an approach to responsible fisheries management. *Mar. Freshw. Res.*, *52*(8), 1623-1631.

Coleman, M. D., Ha, S. D., Haeryfar, S. M., Barr, S. D., and Kim, S. O. (2018). Cathepsin B plays a key role in optimal production of the influenza A virus. *J Virol Antiviral Res*, 2018, 1. https://doi.org/10.4172/2324-8955.1000178

Coe, H., Schneider, J. D., Dabrowska, M., Groenendyk, J., Jung, J., Michalak, M. (2012). Role of cysteine amino acid residues in calnexin. *Mol. Cell. Biochem.*, 359(1–2).

Cruz, R., and Phillips, B. F. (2000). The artificial shelters (pesqueros) used for the Spiny Lobster (*Panulirus argus*) fisheries in Cuba, in Phillips, B.F., Kittaka, J (Eds.), Spiny Lobsters: Fisheries and Culture, Second Edition, Blackwell, Oxford, pp. 400–419. doi:10.1002/9780470698808.ch22.

Cryan, J. F., O'riordan, K. J., Cowan, C. S. M., Sandhu, K. V., Bastiaanssen, T. F. S., Boehme, M., et al. (2019). The microbiota-gut-brain axis. *Physiol. Rev., 99,* 1877–2013. doi:10.1152/physrev.00018.2018.

D'Aniello, A. (1980). Free amino acids in some tissues of marine crustacea. *Experientia, 36,* 392–393. doi:10.1007/BF01975105.

DaCILn, D., and Ulanova, M. (2013). The role of human beta-defensin-2 in *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection in cystic fibrosis patients. *Infect Dis Ther*, *2*(2), 159-166. doi:10.1007/s40121-013-0015-5.

Daubner, S. C., Le, T., and Wang, S. (2011). Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, *508*(1), 1-12. doi:10.1016/j.abb.2010.12.017.

Davies, C. E., Briones-Fourzán, P., Barradas-Ortiz, C., Negrete-Soto, F., Moo-Cocom, G., Lozano-Álvarez, E. (2020). Do ecological characteristics drive the prevalence of Panulirus argus virus 1 (PaV1) in juvenile Caribbean spiny lobsters in a tropical reef lagoon? *PLoS ONE, 15*: e0229827. doi:10.1371/journal.pone.0229827

De Paz-Lugo, P., Lupiáñez, J. A., and Meléndez-Hevia, E. (2018). High glycine concentration increases collagen synthesis by articular chondrocytes *in vitro*: acute

glycine deficiency could be an important cause of osteoarthritis. *Amino Acids, 50,* 1357–1365. doi:10.1007/s00726-018-2611-x.

Delgado, T., Sanchez, E. L., Camarda, R., and Lagunoff, M. (2012). Global metabolic profiling of infection by an oncogenic virus: KSHV induces and requires lipogenesis for survival of latent infection. *PLoS Pathogens 8,* e1002866. doi:10.1371/journal.ppat.1002866.

Ding, Z., Jin, M., Ren, Q. (2018). Transcriptome analysis of *Macrobrachium rosenbergii* intestines under the white spot syndrome virus and poly (I: C) challenges. *PLoS ONE*, *13*(9), e0204626.

Ding, Z., An, K., Xie, L., Wu, W., Zhang, R., Wang, D., *et al.* (2017). Transmissible gastroenteritis virus infection induces NF-κB activation through RLR-mediated signaling. *Virology*, 507, 170-178.

Dolan, T. W., and Butler, M. J. (2006). The adaptive value of aggregation among juvenile Caribbean spiny lobster: An evaluation using individual-based modeling. *J. Crust. Biol., 26,* 565–578. doi:10.1651/s-2742.1.

Dona, A. C., Kyriakides, M., Scott, F., Shephard, E. A., Varshavi, D., Veselkov, K., and Everett, J. R. (2016). A guide to the identification of metabolites in NMR-based metabonomics/metabolomics experiments. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, *14*, 135-153. doi:10.1016/j.csbj.2016.02.005.

Dreyfuss, G., Kim, V. N., Kataoka, N. (2002). Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(3), 195-205.

Du, Z., Jin, Y., Ren, D. (2016). In-depth comparative transcriptome analysis of intestines of red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, infected with WSSV. *Sci. Rep.*, 6(1), 1-12.

Dudeja, V., Vickers, S. M., Saluja, A. K. (2009). The role of heat shock proteins in gastrointestinal diseases. *Gut*, 58(7), 1000-1009.

Eggleston, D. B., and Lipcius, R. N. (1992). Shelter selection by spiny lobster under variable predation risk, social conditions, and shelter size. *Ecology, 73,* 992–1011. doi:10.2307/1940175.

Fan, W., Ye, Y., Chen, Z., Shao, Y., Xie, X., Zhang, W., *et al*. (2016). Metabolic product response profiles of *Cherax quadricarinatus* towards white spot syndrome virus infection. *Dev. Comp. Immunol.*, *61*, 236-241. doi:10.1016/j.dci.2016.04.006.

Fedotova, M. V., and Kruchinin, S. E. (2017). Hydration and ion-binding of glycine betaine: how they may be involved into protection of proteins under abiotic stresses. *J. Mol. Liq.*, *244*, 489-498. doi:10.1016/j.molliq.2017.08.117.

Feinberg, M. W., Wara, A. K., Cao, Z., Lebedeva, M. A., Rosenbauer, F., Iwasaki, H., et al.. (2007). The Kruppel-like factor KLF4 is a critical regulator of monocyte differentiation. *EMBO Journal*, 26(18), 4138-4148.

Freire, C. A., Onken, H., and McNamara, J. C. (2008). A structure–function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comp. Biochem. Physiol., Mol. amp; Integr. Physiol.*, *151*(3), 272-304. doi:10.1016/j.cbpa.2007.05.008.

García, M. A., Gallego, P., Campagna, M., González-Santamaría, J., Martínez, G., Marcos-Villar, L., et al. (2009). Activation of NF-kB pathway by virus infection requires Rb expression. *PLoS ONE*, 4(7), e6422.

Garçon DP, Lucena MN, França JL, McNamara JC, Fontes CF, Leone FA. (2011). $Na^+$,$K^+$-ATPase activity in the posterior gills of the blue crab, Callinectes ornatus (Decapoda, Brachyura): modulation of ATP hydrolysis by the biogenic amines spermidine and spermine. *J. Membr. Biol*. 244(1), 9-20. doi: 10.1007/s00232-011-9391-5.

Geihs, M. A., Maciel, F. E., Vargas, M. A., Cruz, B. P., and Nery, L. E. M. (2013). Effects of hypoxia and reoxygenation on the energetic metabolism of the crab *Neohelice granulata* (Decapoda, Varunidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, *445*, 69-78. doi:10.1016/j.jembe.2013.03.019.

Geihs, M. A., Vargas, M. A., Maciel, F. E., Caldas, S. S., Cruz, B. P., Primel, E. G., et al. (2010). Effect of melatonin in the antioxidant defense system in the locomotor muscles of the estuarine crab *Neohelice granulata* (Decapoda, Brachyura). *Gen. Comp. Endocrinol.*, *166*(1), 72-82. doi:10.1016/j.ygcen.2009.09.018.

Ginestet, C. 2011. ggplot2: elegant graphics for data analysis. *JJ. R. Stat. Soc. A Stat. Soc.,* 174 (1): 245–46.

González, O., Fontanes, V., Raychaudhuri, S., Loo, R., Loo, J., Arumugaswami, V., et al. (2009). The heat shock protein inhibitor Quercetin attenuates hepatitis C virus production. *Hepatology*, 50(6), 1756-1764.

Grimes, J. M., Khan, S., Badeaux, M., Rao, R. M., Rowlinson, S. W., and Carvajal, R. D. (2021). Arginine depletion as a therapeutic approach for patients with COVID-19. *Int. J. Infect. Dis., 102*, 566–570. doi:10.1016/j.ijid.2020.10.100.

Groenendijk, B. C., Hierck, B. P., Gittenberger- de Groot, A. C., Poelmann, R. E. (2004). Development-related changes in the expression of shear stress responsive genes KLF-2, ET-1, and NOS-3 in the developing cardiovascular system of chicken embryos. *Dev. Dyn.*, 230(1), 57-68.

Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., et al. (2013). *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat. Prot.*, 8(8), 1494-1512.

Hakim, M., Fass, D. (2010). Cytosolic disulfide bond formation in cells infected with large nucleocytoplasmic DNA viruses. *Antioxid. Redox Signal.*, 13(8), 1261-1271.

Herrera-Salvatierra, N., Pascual-Jiménez, C., Huchin-Mian, J. P., Lozano-Álvarez, E., Montero-Muñoz, J., Briones-Fourzán, P., Rodríguez-Canul, R. (2019). Nutritional and immunological evaluation of juvenile spiny lobsters *Panulirus argus* (Latreille, 1804) (Decapoda: Achelata: Palinuridae) naturally infected with the PaV1 virus. *J. Crust. Biol., 39*, 162–171. doi:10.1093/jcbiol/ruy108.

Hervant, F., Mathieu, J., Garin, D., and Fréminet, A. (1995). Behavioral, ventilatory, and metabolic responses to severe hypoxia and subsequent recovery of the hypogean *Niphargus rhenorhodanensis* and the epigean *Gammarus fossarum* (Crustacea: Amphipoda). *Physiol. Zool.*, *68*(2), 223-244. doi:10.1086/physzool.68.2.30166501.

Horsefield, R., Yankovskaya, V., Sexton, G., Whittingham, W., Shiomi, K., Omura, S., Byrne, B., Cecchini, G., Iwata, S. (2006). Structural and computational analysis of the quinone-binding site of complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase): A mechanism of electron transfer and proton conduction during ubiquinone reduction. *JBC*, 281(11), 7309-7316.

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

Hossain, M. S., Dai, J., Qiu, D. (2021). Dysbiosis of the shrimp (*Penaeus monodon*) gut microbiome with AHPND outbreaks revealed by 16S rRNA metagenomics analysis. *Aquacult. Res.*, *52*(7), 3336-3349.

Huang, H., Huang, C., Guo, L., Zeng, C., Ye, H. (2019). Profiles of calreticulin and $Ca^{2+}$

concentration under low temperature and salinity stress in the mud crab, *Scylla paramamosain*. *PLoS ONE*, 14(7), e0220405.

Huang, Z., Aweya, J. J., Zhu, C., Tran, N. T., Hong, Y., Li, S., *et al*. (2020). Modulation of crustacean innate immune response by amino acids and their metabolites: Inferences from other species. *Front. Immunol., 11*, 574721. doi:10.3389/fimmu.2020.574721.

Huchin-Mian, J. P., Rodríguez-Canul, R., Arias-Bañuelos, E., Simá-Álvarez, R., Pérez-Vega, J. A., Briones-Fourzán, P., and Lozano-Álvarez, E. (2008). Presence of Panulirus argus Virus 1 (PaV1) in juvenile spiny lobsters *Panulirus argus* from the Caribbean coast of Mexico. *Dis. Aquat. Org.*, *79*(2), 153-156. doi:10.3354/dao01898.

Huchin-Mian, J.P., Briones-Fourzán, P., Simá-Álvarez, R., Cruz-Quintana, Y., Antonio Pérez-Vega, J., Lozano-Álvarez, E., et al. (2009). Detection of Panulirus argus Virus 1 (PaV1) in exported frozen tails of subadult-adult Caribbean spiny lobsters *Panulirus argus*. *Dis. Aquat. Org., 86,* 159–162. doi:10.3354/dao02117.

Huchin-Mian, J. P., Rodríguez-Canul, R., Briones-Fourzán, P., Lozano-Álvarez, E. (2013). Panulirus argus virus 1 (PaV1) infection prevalence and risk factors in a Mexican lobster fishery employing casitas. *Dis. Aquat. Org., 107*, 87–97. doi:10.3354/dao02676.

Humer, E., Probst, T., and Pieh, C. (2020). Metabolomics in psychiatric disorders: What we learn from animal models. *Metabolites, 10*, 72. doi:10.3390/metabo10020072.

Ishida, H., Kato, T., Takehana, K., Tatsumi, T., Hosui, A., Nawa, T., et al. (2013). Valine, the branched-chain amino acid, suppresses hepatitis C virus RNA replication but promotes infectious particle formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun., 437,* 127–133. doi:10.1016/j.bbrc.2013.06.051.

Jalal, C., Uhlmann-Schiffler, H., Stahl, H. (2007). Redundant role of Dead box proteins p68 (Ddx5) and p72/p82 (Ddx17) in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Nucleic Acids Research*, 35(11), 3590-3601.

Jawahar, J., McCumber, A. W., Lickwar, C. R., Amoroso, C. R., de la Torre Canny, S. G., Wong, S., ... & Rawls, J. F. (2022). Starvation causes changes in the intestinal transcriptome and microbiome that are reversed upon refeeding. *BMC genomics*, *23*(1), 1-19.

Jin, M., Zhou, Q. C., Wang, M. Q., Huo, Y. W., Huang, W. W., and Mai, K. S. (2016). Dietary arginine requirement of juvenile swimming crab, *Portunus trituberculatus*. *Aquac. Nut., 22*, 1174–1184. doi:10.1111/anu.12350.

Jones, P., Binns, D., Chang, H. Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., et al. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30(9), 1236-1240.

Jung, H., Lyons, R. E., Dinh, H., Hurwood, D. A., McWilliam, S., Mather, P. B. (2011). Transcriptomics of a giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): de novo assembly, annotation and marker discovery. *PloS one*, 6(12), e27938.

Kalifa, Y., Huang, T., Rosen, L. N., Chatterjee, S., Gavis, E. R. (2006). Glorund, a *Drosophila* hnRNP F/H homolog, is an ovarian repressor of nanos translation. *Dev. Cell*, 10(3), 291-301.

Kanehisa, M., Sato, Y. (2020). KEGG Mapper for inferring cellular functions from protein sequences. *Prot. Sci.*, 29(1), 28-35.

Kanehisa, M., Sato, Y., Morishima, K. (2016). BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *J. Mol. Biol.*, 428(4), 726-731.

Kaufman, S. (1993). New tetrahydrobiopterin-dependent systems. *Annu. Rev. Nutr., 13,* 261–286. doi:10.1146/annurev.nutr.13.1.261.

Kawaguchi, T., Torimura, T., Takata, A., Satomi, S., and Sata, M. (2012). Valine, a branched-chain amino Acid, reduced HCV viral load and led to eradication of HCV by interferon therapy in a decompensated cirrhotic patient. *Case Rep. Gastroenterol.*, *6*(3), 660-667. doi:10.1159/000343094.

Kim, D. J., Oh, B., Kim, Y. Y. (2009). Splicing factor ASF/SF2 and transcription factor PPAR-γ cooperate to directly regulate transcription of uncoupling protein-3. *BBA - Biomembranes.*, 378(4), 877-882.

Kleinridders, A., Pogoda, H. M., Irlenbusch, S., Smyth, N., Koncz, C., Hammerschmidt, M., Brüning, J. C. (2009). PLRG1 is an essential regulator of cell proliferation and apoptosis during vertebrate development and tissue homeostasis. *Molecular and Cellular Biology*, 29(11), 3173-3185.

Kumar, M., Rawat, P., Khan, S. Z., Dhamija, N., Chaudhary, P., Ravi, D. S., Mitra, D. (2011). Reciprocal regulation of human immunodeficiency virus-1 gene expression and replication by heat shock proteins 40 and 70. *J. Mol. Biol.*, 410(5), 944-958.

Kvansakul, M. (2017). Viral infection and apoptosis. *Viruses, 9,* 356. doi:10.3390/v9120356.

Land, M. F. 1996. Les yeux: structure et fonctionnement des mécanismes optiques. In Traité de Zoologie. Anatomie, Systématique, Biologie. Crustacés. Tome VII, Fascicule II. Généralités (suite) et Systématique, ed. J. Forest, 1-42. Paris: Masson, 1002 pp.

Lange, A., Schäfer, A., Bender, A., Steimle, A., Beier, S., Parusel, R., Frick, J. S. (2018). *Galleria mellonella*: a novel invertebrate model to distinguish intestinal symbionts from pathobionts. *Front. Immunology*, 9, 2114.

Laverack, M. S. (1964). The antennular sense organs of *Panulirus argus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, *13*(4), 301-321.

Lee, D. C., Sohn, H. A., Park, Z. Y., Oh, S., Kang, Y. K., Lee, K. M., et al. (2015). A lactate-induced response to hypoxia. *Cell, 161,* 595-609. doi:10.1016/j.cell.2015.03.011.

Lefèvre, P. L. C., Palin, M. F., and Murphy, B. D. (2011). Polyamines on the reproductive landscape. *Endoc. Rev. 32,* 694–712. doi:10.1210/er.2011-0012.

Li, C., Shields, J. D. (2007). Primary culture of hemocytes from the Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus*, and their susceptibility to Panulirus argus Virus 1 (PaV1). *J. Invertebr. Pathol.*, 94(1), *4*8-55.

Li, C., Shields, J. D., Ratzlaff, R. E., Butler, M. J. (2008). Pathology and hematology of the Caribbean spiny lobster experimentally infected with Panulirus argus virus 1 (PaV1). *Virus Research*, 132(1-2), 104-113. doi:10.1016/j.virusres.2007.11.005.

Li, J. T., Lee, P. P., Chen, O. C., Cheng, W., and Kuo, C. M. (2005). Dopamine depresses the immune ability and increases susceptibility to *Lactococcus garvieae* in the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol., 19,* 269–280. doi:10.1016/j.fsi.2005.01.003.

Li, W., Godzik, A. (2006). Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 22(13), 1658-1659.

Li, C., Wang, S., He, J., 2019. The Two NF-κB Pathways Regulating Bacterial and WSSV Infection of Shrimp. *Front. Immunol.* https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01785

Li, H., Yin, B., Wang, S., Fu, Q., Xiao, B., Lǔ, K., He, J., Li, C., 2018. RNAi screening identifies a new Toll from shrimp *Litopenaeus vannamei* that restricts WSSV infection through activating Dorsal to induce antimicrobial peptides. PLoS Pathog. 14. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007109

Li, W., Godzik, A. (2006). Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 22(13), 1658-1659.

Li, X., Meng, X., Kong, J., Luo, K., Luan, S., Cao, B. et al. (2013). Molecular cloning and characterization of a cathepsin B gene from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol.*, 35(5), 1604-1612.

Lin, C., Yang, L., Yang, J. J., Huang, Y., Liu, Z. R. (2005). ATPase/helicase activities of p68 RNA helicase are required for pre-mRNA splicing but not for assembly of the spliceosome. *Mol. Cell. Biol.*, 25(17), 7484-7493.

Lin, S., Tian, L., Shen, H., Gu, Y., Li, J. L., Chen, Z. et al. (2013). DDX5 is a positive regulator of oncogenic NOTCH1 signaling in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene*, 32(40), 4845-4853.

Liu, J., Wang, K., Wang, Y., Chen, W., Jin, Z., Yao, Z., Zhang, D. (2019). Strain-specific changes in the gut microbiota profiles of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to cold stress. *Aquaculture*, 503, 357-366.

Liu, P., Yin, Y., Gong, Y., Qiu, X., Sun, Y., Tan, L., et al. (2019). In vitro and in vivo metabolomic profiling after infection with virulent Newcastle disease virus. *Viruses, 11*, 962. doi:10.3390/v11100962.

Liu, Z. R. (2002). p68 RNA helicase is an essential human splicing factor that acts at the U1 snRNA-5′ splice site duplex. *Molecular and Cellular Biology*, 22(15), 5443-5450.

López-Otín C, Bond JS. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *The JBC*. 283(45)

Lozano-Álvarez, E., Briones-Fourzán, P., González-Cano, J. (1991). Pesca exploratoria de langostas con nasas en la plataforma continental del área de Puerto Morelos, QR, México. *An. Inst. Cienc. Mar. Limnol. Univ. Nac. Auton. Mex.*, *18*(1), 49-58.

Lozano-Álvarez, E., Briones-Fourzán, P., Ramírez-Estévez, A., Placencia-Sánchez, D., Huchin-Mian, J. P., Rodríguez-Canul, R. (2008). Prevalence of Panulirus argus Virus 1 (PaV1) and habitation patterns of healthy and diseased Caribbean spiny lobsters in shelter-limited habitats. *Dis Aquat. Org.*, 80(2), 95-104.

Lucena, M. N., Garçon, D. P., Fontes, C. F. L., McNamara, J. C., Leone, F. A. (2017). Polyamines regulate phosphorylation–dephosphorylation kinetics in a crustacean gill (Na+, K+)-ATPase. *Mol. Cell. Biochem.*, *429*(1), 187-198.

Lv, Q., Guo, K., Zhang, G., Zhang, Y. (2016). The ORF4 protein of porcine circovirus type 2 antagonizes apoptosis by stabilizing the concentration of ferritin heavy chain through physical interaction. *J. Gen. Virol.*, 97(7), 1636-1646.

Malley, D. F. (1977). Salt and water balance of the spiny lobster, *Panulirus argus*: the role of the antennal glands. *Journal of Experimental Biology*, *70*(1), 221-230.

Mapanao, R., Chang, C. C., Cheng, W., Liu, K. F. (2018). Silencing tyrosine hydroxylase retards depression of immunocompetence of *Litopenaeus vannamei* under hypothermal stress. *Fish Shellfish Immunol., 72*, 519–527. doi:10.1016/j.fsi.2017.11.035.

Marx, J. and Herrnkind, W. (1985). Factors Regulating Microhabitat Use by Young Juvenil Spiny Lobsters, *Panulirus argus*: Food and Shelter. J. Crust. Biol. 5: 650-657.

Marx, J. M., Herrnkind, W. F. (1985). Macroalgae (Rhodophyta: Laurencia spp.) as habitat for young juvenile spiny lobsters, *Panulirus argus*. *Bulletin of Marine Science*, *36*(3), 423-431.

Matera, A. G., Wang, Z. (2014). A day in the life of the spliceosome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(2), 108-121.

Ma, T. H., Benzie, J. A., He, J. G., Sun, C. B., Chan, S. F. (2014). PmPPAF is a pro-phenoloxidase activating factor involved in innate immunity response of the shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol.*, 44(1), 163-172.

McDonald, D. G., McMahon, B. R., C. M. Wood. An analysis of the acid-base disturbances of haemolymph following strenouos in the dungeness crab, *Cancer magister*. *J. Exp. Biol., 79,* 47–58. doi:10.1242/jeb.79.1.47.

Medina, C., Radomski, M. W. (2006). Role of matrix metalloproteinases in intestinal inflammation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 318(3), 933-938.

Menzel, K., Hausmann, M., Obermeier, F., Schreiter, K., Dunger, N., Bataille, F., Falk, W., Scholmerich, J., Herfarth, H., Rogler, G. (2006), Cathepsins B, L and D in inflammatory bowel disease macrophages and potential therapeutic effects of cathepsin inhibition *in vivo*. *Clin. Exp. Immunol. Abbreviation*, 146: 169-180.

Meyer, F. (2016). Viral interactions with components of the splicing machinery. *Prog Mol Biol Transl Sci.*, *142*: 241-268.

Michlewski, G., Sanford, J. R., Cáceres, J. F. (2008). The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1. *Mol. Cell*, 30(2), 179-189.

Mihaylova, M. M., Shaw, R. J. (2011). The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat. Cell Biol.*, 13(9), 1016–1023.

Mineshiba, F., Takashiba, S., Mineshiba, J., Matsuura, K., Kokeguchi, S., and Murayama, Y. (2003). Antibacterial activity of synthetic human B defensin-2 against periodontal bacteria. *J. Int. Acad. Periodontol., 5,* 35–40.

Mittal, R., Debs, L. H., Patel, A. P., Nguyen, D., Patel, K., O'Connor, G., *et al*. (2017). Neurotransmitters: The critical modulators regulating gut–brain axis. *J. Cell. Physiol.*, 232(9), 2359-2372.

Montgomery-Fullerton, M. M., Cooper, R. A., Kauffman, K. M., Shields, J. D., Ratzlaff, R. E. (2007). Detection of Panulirus argus Virus 1 in Caribbean spiny lobsters. *Dis. Aquat. Organ.*, 76(1), 1-6.

Moreno-Altamirano, M. M. B., Kolstoe, S. E., Sánchez-García, F. J. (2019). Virus control of cell metabolism for replication and evasion of host immune responses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 95.

Nadler-Holly, M., Breker, M., Gruber, R., Azia, A., Gymrek, M., Eisenstein, M., Willison, K. R., Schuldiner, M., Horovitz, A. (2012). Interactions of subunit CCT3 in the yeast chaperonin CCT/TRiC with Q/N-rich proteins revealed by high-throughput microscopy analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109(46), 18833-18838.

Novakova, K., Kummer, O., Bouitbir, J., Stoffel, S. D., Hoerler-Koerner, U., Bodmer, M., *et al*. (2016). Effect of L-carnitine supplementation on the body carnitine pool, skeletal muscle energy metabolism and physical performance in male vegetarians. *Eur. J. Nutr., 55,* 207–217. doi:10.1007/s00394-015-0838-9.

Novoyatleva, T., Tang, Y., Rafalska, I., Stamm, S. (2006). Pre-mRNA missplicing as a cause of human disease. *Altern. Splic. Dis.*, 27-46.

O'Mahony, S. M., Clarke, G., Borre, Y. E., Dinan, T. G., Cryan, J. F. (2015). Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behav. Brain Res.*, 277, 32-48.

Omlin, T., Weber, J. M. (2010). Hypoxia stimulates lactate disposal in rainbow trout. *J. Exp. Biol. 213,* 3802–3809. doi:10.1242/jeb.048512.

Ohgami, R. S., Campagna, D. R., McDonald, A., Fleming, M. D. (2006). The Steap proteins are metalloreductases. *Blood*, 108(4), 1388-1394.

Ooi, M. C., Goulden, E. F., Smith, G. G., Nowak, B. F., Bridle, A. R. (2017). Developmental and gut-related changes to microbiomes of the cultured juvenile spiny lobster *Panulirus ornatus*. *FEMS Microbiol Ecol.*, *93*(12), fix159.

Oromi, N., Jové, M., Pascual-Pons, M., Royo, J. L., Rocaspana, R., Aparicio, E., *et al*. (2017). Differential metabolic profiles associated to movement behavior of stream-resident brown trout (*Salmo trutta*). *PLoS ONE* 12, e0181697. doi:10.1371/journal.pone.0181697.

Ostaff, M. J., Stange, E. F., and Wehkamp, J. (2013). Antimicrobial peptides and gut microbiota in homeostasis and pathology. *EMBO Mol. Med., 5,* 1465–1483. doi:10.1002/emmm.201201773.

Pascual-Jiménez, C., Huchin-Mian, J.P., Simões, N., Briones-Fourzán, P., Lozano-Álvarez, E., Sánchez-Arteaga, A., Pérez-Vega, J.A., Simá-Álvarez, R., Rosas-Vazquez, C., Rodríguez-Canul, R. (2012). Physiological and immunological characterization of Caribbean Spiny Lobsters *Panulirus argus* naturally infected with Panulirus argus Virus 1 (PaV1). *Dis Aquat Org.*, 100(2), 113–24.

Perera, E., Moyano, F.J., Díaz, M., Perdomo-Morales, R., Montero-Alejo, V., Rodriguez-Viera, L., Lonao, E., Carrillo, O. Galich, G.S. (2008). Changes in digestive enzymes through developmental and molt stages in the spiny lobster, *Panulirus argus*. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 151: 250–256.

Petrof, E. O., Ciancio, M. J., Chang, E. B. (2004). Role and regulation of intestinal epithelial heat shock proteins in health and disease. *Chin. J. Dig. Dis.*, 5(2), 45-50.

Phillips, B. F., Melville-Smith, R., Kay, M. C., and Vega-Velázquez, A. (2013). “Panulirus species,” in Phillips, B.F. (Ed.), Lobsters: Biology, Management, Aquaculture and Fisheries: Second Edition. Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 289–325. doi:10.1002/9781118517444.ch10.

Pickard, J. M., Zeng, M. Y., Caruso, R., Núñez, G. (2017). Gut microbiota: role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol Rev.*, 279(1), 70-89.

Plagányi, É. E., Weeks, S. J., Skewes, T. D., Gibbs, M. T., Poloczanska, E. S., Norman-López, A., *et al*. (2011). Assessing the adequacy of current fisheries management under changing climate: a southern synopsis. *ICES J. Mar. Sci.*, *68*(6), 1305-1317. https://doi.org/10.1093/icesjms/fsr049

Polati, R., Castagna, A., Bossi, A. M., Alberio, T., De Domenico, I., Kaplan, J., *et al*. (2012). Murine macrophages response to iron. *J. Proteomics*, *76*, 10-27.

Puchades-Carrasco, L., Palomino-Schätzlein, M., Pérez-Rambla, C., and Pineda-Lucena, A. (2016). Bioinformatics tools for the analysis of NMR metabolomics studies focused on the identification of clinically relevant biomarkers. *Brief. Bioinform., 17*, 541–552. doi:10.1093/bib/bbv077.

Quintana, Y. C., Canul, R. R., Martínez, V. M. V. (2011). First evidence of Panulirus argus Virus 1 (PaV1) in spiny lobster from Cuba and clinical estimation of its prevalence. *Diseases of Aquatic Organisms*, 93(2), 141-147.

Ramani, D., De Bandt, J. P., Cynober, L. (2014). Aliphatic polyamines in physiology and diseases. *Clin. Nutr., 33*. doi:10.1016/j.clnu.2013.09.019.

Rathore, A. P., Haystead, T., Das, P. K., Merits, A., Ng, M. L., Vasudevan, S. G. (2014). Chikungunya virus nsP3 & nsP4 interacts with HSP-90 to promote virus replication: HSP-90 inhibitors reduce CHIKV infection and inflammation in vivo. *Antiviral Res.*, 103, 7-16.

Ravanbakhsh, S., Liu, P., Bjordahl, T. C., Mandal, R., Grant, J. R., Wilson, M., *et al*. (2015). Accurate, fully-automated NMR spectral profiling for metabolomics. *PLoS ONE, 10,* e0124219. doi:10.1371/journal.pone.0124219.

Razak, M. A., Begum, P. S., Viswanath, B., and Rajagopal, S. (2017). Multifarious beneficial effect of nonessential amino acid, glycine: A review. *Oxid. Med. Cell. Longev., 2017,* 1716701. doi:10.1155/2017/1716701.

Rees, D. C., Johnson, E., & Lewinson, O. (2009). ABC transporters: the power to change. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, *10*(3), 218-227.

Ren, Q., Zhang, X. W., Sun, Y. D., Sun, S. S., Zhou, J., Wang, Z. H., Zhao, F. H., Wang, J. X. (2010). Two cysteine proteinases respond to bacterial and WSSV challenge in Chinese white shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol.*, 29(4), 551-556.

Ren, W., Rajendran, R., Zhao, Y., Tan, B., Wu, G., Bazer, F. W., *et al.* (2018). Amino acids as mediators of metabolic cross talk between host and pathogen. *Front. Immunol., 9*, 319. doi:10.3389/fimmu.2018.00319.

Robinson, Mark D., Davis J. McCarthy, Gordon K. Smyth. (2009). EdgeR: A bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26(1), 139–40.

Romero-Brey, I., Bartenschlager, R. (2016). Endoplasmic reticulum: The favorite intracellular niche for viral replication and assembly. *Viruses*, 8(6), 1–26.

Rosas, C., Cooper, E. L. Pascual C., Brito R., Gelabert R., Moreno T., Miranda G. , Sánchez A. (2004). Indicators of physiological and immunological status of *Litopenaeus setiferus* wild populations (Crustacea, Penaeidae). *Mar. Biol., 145*, 401–413. doi: 10.1007/s00227-004-1321-y

Roseth, S., Fonnum, F. (1995). A study of the uptake of glutamate, γ-aminobutyric acid (GABA), glycine and β-alanine in synaptic brain vesicles from fish and avians. *Neurosci. Lett., 183,* 62–66. doi:10.1016/0304-3940(94)11115-Y.

Ross, E. P., Behringer, D. C., Bojko, J. (2019). White spot syndrome virus and the Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus*: Susceptibility and behavioral immunity. *J. Invertebr. Pathol., 162,* 1–9. doi:10.1016/j.jip.2019.02.001.

Sadok, A., & Marshall, C. J. (2014). Rho GTPases: masters of cell migration. *Small GTPases*, *5*(4), e983878.

Sainath, S. B., Swetha, C., Reddy, P. S. (2013). What do we (need to) know about the melatonin in crustaceans? *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol., 319*, 365–377. doi:10.1002/jez.1800.

Sanchez, E. L., and Lagunoff, M. (2015). Viral activation of cellular metabolism. *Virology*, *479*, 609-618.

Sapcariu, S. C., Kanashova, T., Weindl, D., Ghelfi, J., Dittmar, G., and Hiller, K. (2014). Simultaneous extraction of proteins and metabolites from cells in culture. *MethodsX, 1,* 74–80. doi:10.1016/j.mex.2014.07.002.

Saul, S. (2004, December). A review of the literature and life history study of the Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus*. Caribbean Southeast Data Assessment Review Workshop Report SEDARDW-05 Sustainable Fisheries Division

Contribution No SFD-2004-048. National Marine Fisheries Service Southeast Fisheries Science Center Sustainable Fisheries Division.

Savic, I., Hedén-Blomqvist, E., Berglund, H. (2009). Pheromone signal transduction in humans: What can be learned from olfactory loss. *Hum. Brain Mapp., 30,* 3057–3065. doi:10.1002/hbm.20727.

Shabani, S., Kamio, M., Derby, C. D. (2008). Spiny lobsters detect conspecific blood-borne alarm cues exclusively through olfactory sensilla. *J. Exp. Biol., 211*, 2600–2608. doi:10.1242/jeb.016667.

Schaller, M. (2006). Parasites, behavioral defenses, and the social psychological mechanisms through which cultures are evoked. Psychol. Inq. **17** (2), 96–101.

Scheiner, R., Sokolowski, M. B., Erber, J. (2004). Activity of cGMP-dependent protein kinase (PKG) affects sucrose responsiveness and habituation in *Drosophila melanogaster*. *Learning & Memory*, 11(3), 303-311.

Schuh, R., Aicher, W., Gaul, U., Côte, S., Preiss, A., Maier, D., *et al*. (1986). A conserved family of nuclear proteins containing structural elements of the finger protein encoded by Krüppel, a *Drosophila* segmentation gene. *Cell*, 47(6), 1025-1032.

Seong, R. K., Kim, J. A., Shin, O. S. (2018). Wogonin, a flavonoid isolated from *Scutellaria baicalensis*, has antiviral activities against influenza infection via modulation of AMPK pathways. *Acta Virologica*, 62(1), 78-85.

Sheweita, S. A., & Alsamghan, A. S. (2020). Molecular mechanisms contributing bacterial infections to the incidence of various types of cancer. *Mediators of Inflammation*, *2020*.

Shields, J. D., Behringer Jr, D. C. (2004). A new pathogenic virus in the Caribbean spiny lobster *Panulirus argus* from the Florida Keys. *Dis. Aqua. Org.*, 59(2), 109-118.

Silva, E. C. C., Masui, D. C., Furriel, R. P. M., Mantelatto, F. L. M., McNamara, J. C., Barrabin, H., ... & Fontes, C. F. L. (2008). Regulation by the exogenous polyamine spermidine of Na, K-ATPase activity from the gills of the euryhaline swimming crab Callinectes danae (Brachyura, Portunidae). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, *149*(4), 622-629.

Silva-Sanchez, C., Chen, S., Li, J., Chourey, P. S. (2014). A comparative glycoproteome study of developing endosperm in the hexose-deficient miniature1 (mn1) seed

mutant and its wild type Mn1 in maize. *Front. Plant Sci., 5*, 63. doi:10.3389/fpls.2014.00063.

Siva Sankar, R., Yogamoorthi, A. (2012). Free amino acid composition in hemolymph and muscle of the ghost crab, *Ocypode platytarsis*. *Pakistan J. Biol. Sci., 15*, 490–495. doi:10.39231pjbs.2012.490.49.

Sivakumar, P., Suguna, L., and Chandrakasan, G. (2000). Molecular species of collagen in the intramuscular connective tissues of the marine crab, *Scylla serrata*. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol., 125*, 555–562. doi:10.1016/S0305-0491(00)00167-X.

Soñanez-Organis, J. G., Miranda-Cruz, M. M., Poom-Llamas, J. J., Stephens-Camacho, N. A., Adan-Bante, N. P., Rosas-Rodríguez, J. A. (2019). Betaine aldehyde dehydrogenase is regulated during wssv infection in white shrimp. *Invertebr. Surviv. J., 16*, 113–119.

Stamm, S., Ben-Ari, S., Rafalska, I., Tang, Y., Zhang, Z., Toiber, D., Soreq, H. (2005). Function of alternative splicing. *Gene*, 344, 1-20.

Stevens, E. D., Arlinghaus, R., Browman, H. I., Cooke, S. J., Cowx, I. G., Diggles, B. K. (2016). Stress is not pain. Comment on Elwood and Adams (2015). Electric shock causes physiological stress responses in shore crabs, consistent with prediction of pain. *Biol. Lett., 12*, 20151006. doi:10.1098/rsbl.2015.1006.

Stowers, L., Liberles, S. D. (2016). State-dependent responses to sex pheromones in mouse. *Curr. Opin. Neurobiol. 38*, 74–79. doi:10.1016/j.conb.2016.04.001.

Subramaniam, K., Behringer, D. C., Bojko, J., Yutin, N., Clark, A. S., Bateman, K. S., Waltzek, T. B. (2020). A new family of DNA viruses causing disease in crustaceans from diverse aquatic biomes. *MBio*, 11(1), e02938-19.

Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N., Šmuc, T. (2011). REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS ONE*, *6*(7), e21800.

Tak, P. P., Firestein, G. S. (2001). NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Investigation*, 107(1), 7-11.

Törönen, P., Medlar, A., Holm, L. (2018). PANNZER2: a rapid functional annotation web server. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W84-W88.

Tsai, J. R., Lin, H. C. (2014). Functional anatomy and ion regulatory mechanisms of the antennal gland in a semi-terrestrial crab, Ocypode stimpsoni. *Biology open*, *3*(6), 409-417.

Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., Leunissen, J. A. M. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkm306.

Van den Broeke, C., Jacob, T., Favoreel, H. W. (2014). Rho'ing in and out of cells: viral interactions with Rho GTPase signaling. *Small GTPases*, 5(1), e28318.

Vargas-Albores, F., Guzmán, M. A., Ochoa, J. L. (1993). An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, *106*(2), 299-303.

Vreemann, A., Qu, H., Mayer, K., Andersen, L. B., Stefana, M. I., Wehner, S., Brix, K. (2009). Cathepsin B release from rodent intestine mucosa due to mechanical injury results in extracellular matrix damage in early post-traumatic phases. *Biol. Chem.*, 390(5-6), 481-492.

Wang, K. (2014). Molecular mechanisms of hepatic apoptosis. *Cell Death Dis., 5,* e996. doi:10.1038/cddis.2013.499.

Wang, P.H., Gu, Z.H., Wan, D.H., Zhang, M.Y., Weng, S.P., Yu, X.Q., He, J.G. (2011). The shrimp NF-κB pathway is activated by white spot syndrome virus (WSSV) 449 to facilitate the expression of WSSV069 (ie1), WSSV303 and WSSV371. *PLoS One*. 6(9), e24773.

Wang, W., Wu, Z., Dai, Z., Yang, Y., Wang, J., Wu, G. (2013a). Glycine metabolism in animals and humans: Implications for nutrition and health. *Amino Acids, 45,* 463–477. doi:10.1007/s00726-013-1493-1.

Wang, X. W., Xu, Y. H., Xu, J. D., Zhao, X. F., Wang, J. X. (2014). Collaboration between a soluble C-type lectin and calreticulin facilitates White Spot Syndrome Virus Infection in shrimp. *Journal of Immunology*, 193(5), 2106-2117.

Wang, X., Zhang, A., Sun, H. (2013b). Power of metabolomics in diagnosis and biomarker discovery of hepatocellular carcinoma. *Hepatology, 57*, 2072–2077. doi:10.1002/hep.26130.

Wang, Y., Liu, J., Huang, B. O., Xu, Y. M., Li, J., Huang, L. F., *et al*. (2015). Mechanism of alternative splicing and its regulation. *Biomedical Reports*, 3(2), 152-158.

Ward, A. J., Cooper, T. A. (2010). The pathobiology of splicing. *J. Pathol.*, 220(2), 152-163.

Watanabe, D., Wada, M. (2019). Effects of reduced muscle glycogen on excitation–contraction coupling in rat fast-twitch muscle: A glycogen removal study. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 40(3), 353-364.

White, M. K., Bellizzi, A., Ibba, G., Pietropaolo, V., Palamara, A. T., Wollebo, H. S. (2017). The DNA damage response promotes polyomavirus JC infection by nucleus to cytoplasm NF-kappaB activation. *Virol. J.*, 14(1), 1-10.

Wiklund, S., Johansson, E., Sjöström, L., Mellerowicz, E. J., Edlund, U., Shockcor, J. P., *et al*. (2008). Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Anal. Chem., 80*, 115–122. doi:10.1021/ac0713510.

Will, C. L., Cindy L., Lührmann, R. (2011). Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, *3*(7), a003707.

Wilson, B. J., Bates, G. J., Nicol, S. M., Gregory, D. J., Perkins, N. D., Fuller-Pace, F. V. (2004). The p68 and p72 DEAD box RNA helicases interact with HDAC1 and repress transcription in a promoter-specific manner. *BMC Mol. Biol.*, 5(1), 1-15.

Wu, G., Bazer, F. W., Davis, T. A., Kim, S. W., Li, P., Marc Rhoads, J., et al. (2009). Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids, 37*, 153–168. doi:10.1007/s00726-008-0210-y.

Wyatt, T. D. (2009). Fifty years of pheromones. *Nat., 457*, 262–263. doi:10.1038/457262a.

Xie, S. W., Tian, L. X., Jin, Y., Yang, H. J., Liang, G. Y., and Liu, Y. J. (2014). Effect of glycine supplementation on growth performance, body composition and salinity stress of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* fed low fishmeal diet. *Aquaculture*, *418*, 159-164.

Yang, L., Luo, M., Guo, Z., Zuo, H., Weng, S., He, J., Xu, X. (2020). A shrimp gene encoding a single WAP domain (SWD)-containing protein regulated by JAK-STAT and NF-κB pathways. *Developmental & Comparative Immunology*, 104, 103537.

Yao, K., Fang, J., Yin, Y. L., Feng, Z. M., Tang, Z. R., Wu, G. (2011). Tryptophan metabolism in animals: Important roles in nutrition and health. *Front. Biosci. S3*, 286-297. doi:10.2741/s152.

Yao, M., Rosenfeld, J., Attridge, S., Sidhu, S., Aksenov, V., Rollo, C. D. (2009). The ancient chemistry of avoiding risks of predation and disease. *Evol. Biol. 36*, 267–281. doi:10.1007/s11692-009-9069-4.

Ye, J., Fang, L., Zheng, H., Zhang, Y., Chen, J., Zhang, Z., Wang, J. (2006). WEGO: a web tool for plotting GO annotations. *Nucleic Acids Research*, 34(suppl_2), W293-W297.

Yin, H., Zhao, L., Li, S., Xu, L., Wang, Y., Chen, H. (2017). Impaired cellular energy metabolism contributes to duck-enteritis-virus-induced autophagy via the AMPK–TSC2–MTOR signaling pathway. *Front Cell Infect Microbiol.*, 7, 423.

Youkou, K., Toshifumi, A., Yuhei, I., Takahiro, I., Hiroki, T., Atsuo, M., *et al*. (2012). Isoleucine, an essential amino acid, induces the expression of human β defensin 2 through the activation of the G-protein coupled receptor-ERK pathway in the intestinal epithelia. *Food Sci. Nutr.*, *2012*. doi:10.4236/fns.2012.34077.

Zahlten, J., Steinicke, R., Bertrams, W., Hocke, A. C., Scharf, S., Schmeck, B., *et al*. (2013). TLR9-and Src-dependent expression of Krueppel-like factor 4 controls interleukin-10 expression in pneumonia. *Eur. Respir. J.*, 41(2), 384-391.

Zamora-Briseño, J. A., Cerqueda-García, D., Hernández-Velázquez, I. M., Rivera-Bustamante, R., Huchín-Mian, J. P., Briones-Fourzán, P., Lozano-Álvarez, E., Rodríguez-Canul, R. (2020). Alterations in the gut-associated microbiota of juvenile Caribbean spiny lobsters *Panulirus argus* (Latreille, 1804) infected with PaV1. *J. Invertebr. Pathol.*, *176*, 107457.

Zamora-Briseño, J. A., Ruiz-May, E., Elizalde-Contreras, J. M., Hernández-Velázquez, I. M., Hernández-Pérez, A., Fuentes-García, A. G., Rodríguez-Canul, R. (2020). iTRAQ-Based proteomic profile analysis of the hepatopancreas of Caribbean Spiny lobsters infected with Panulirus argus Virus 1: Metabolic and physiological implications. *Front. Microbiol.*, *11*, 1084.

Zhang, H., Xing, Z., Mani, S. K. K., Bancel, B., Durantel, D., Zoulim, F., Andrisani, O. (2016). RNA helicase DEAD box protein 5 regulates Polycomb repressive complex 2/Hox transcript antisense intergenic RNA function in hepatitis B virus infection and

hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, 64(4), 1033-1048.

Zhang, J., Wu, X., Zan, J., Wu, Y., Ye, C., Ruan, X., Zhou, J. (2013). Cellular chaperonin CCTγ contributes to rabies virus replication during infection. *J. Virol.* 87(13), 7608-7621.

Zhang, J., Ye, C., Ruan, X., Zan, J., Xu, Y., Liao, M., Zhou, J. (2014). The chaperonin CCTα is required for efficient transcription and replication of rabies virus. *Microbiol. Immunol.*, *58*(10), 590-599.

Zhao, J., He, S., Minassian, A., Li, J., Feng, P. (2015). Recent advances on viral manipulation of NF-κB signaling pathway. *Curr. Opin. Virol. 15*, 103-111

Zhong, Z., Wheeler, M. D., Li, X., Froh, M., Schemmer, P., Yin, M., *et al*. (2003). L-glycine: A novel anti-inflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 6*, 229–240. doi:10.1097/00075197-200303000-00013.

Zieve, L. (1986). Conditional deficiencies of ornithine or arginine. *J. Am. Coll. Nutr*. 5, 167–176. doi:10.1080/07315724.1986.10720123.

Zimmer--Faust, R. K., and Case, J. F. (1982). Odors influencing foraging behavior of the California spiny lobster, *Panulirus interruptus*, and other decapod crustacea. *Mar. Behav. Physiol. 9*, 35–58. doi:10.1080/10236248209378582.

Zong, X., Fu, J., Xu, B., Wang, Y., Jin, M. (2020). Interplay between gut microbiota and antimicrobial peptides. *Anim. Nutr. 6*, 389–396. doi:10.1016/j.aninu.2020.09.002.

Zou, E., Du, N., Lai, W. (1996). The effects of severe hypoxia on lactate and glucose concentrations in the blood of the Chinese freshwater crab *Eriocheir sinensis* (Crustacea: Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol. - A Physiol. 114*, 105–109. doi:10.1016/0300-9629(95)02101-9.

Zuo, P., Manley, J. L. (1993). Functional domains of the human splicing factor ASF/SF2. *EMBO journal*, 12(12), 4727-4737.

Zoutendyk, P. (1987). Nitrogen excretion by the Cape rock lobster *Jasus lalandii* and its possible contribution to the inshore Benguela system. *S. Afr. J. Mar. Sci.*, *5*, 565-574.