



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

INDUCCIÓN DE ACTIVIDAD ANTIVIRAL POR EL  
SILENCIAMIENTO DEL GEN ENDÓGENO Rab7 EN  
*Litopenaeus vannamei* MEDIANTE RNA DE  
INTERFERENCIA

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
( Orientación Acuicultura )

Presenta

**PÍNDARO ÁLVAREZ RUIZ**

La Paz, Baja California Sur, Diciembre de 2012

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11:30 horas del día 26 del Mes de Noviembre del 2012, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**Inducción de actividad antiviral por el silenciamiento del gen endógeno Rab7 en *Litopenaeus vannamei* mediante RNA de interferencia**

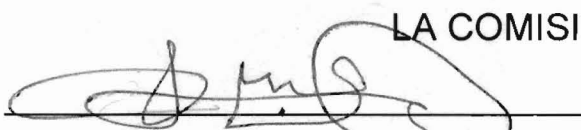
Presentada por el alumno:

**Píndaro Álvarez Ruiz**

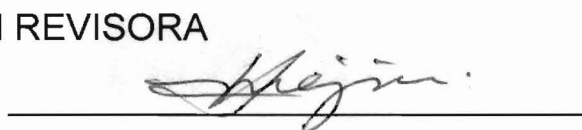
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Acuicultura

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

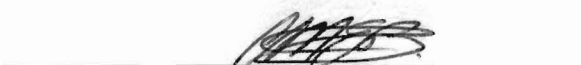
### LA COMISION REVISORA



Dr. FRANCISCO JAVIER MAGALLÓN BARAJAS  
CO-DIRECTOR DE TESIS



Dr. CLAUDIO HUMBERTO MEJÍA RUIZ  
CO-DIRECTOR DE TESIS



Dr. CESAR MARCIAL ESCOBEDO BONILLA  
CO-TUTOR



Dra. SILVIA ALEJANDRA GARCÍA GASCA  
CO-TUTOR



Dra. ANA MARÍA IBARRA HUMPHRIES  
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## **CONFORMACIÓN DE COMITÉS DE TESIS**

### **COMITÉ TUTORIAL**

Dr. Francisco Javier Magallón Barajas (co-Director de Tesis)	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR)
Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz (co-Director de Tesis)	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR)
Dr. Cesar Marcial Escobedo Bonilla (co-Tutor)	Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional. (CIIDIR)
Dra. Ana María Ibarra Humphries (co-Tutor)	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR)
Dra. Silvia Alejandra García Gasca (co-Tutor)	Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD)

### **COMITÉ REVISOR DE TESIS**

Dr. Francisco Javier Magallón Barajas	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR)
Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR)
Dr. Cesar Marcial Escobedo Bonilla	Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional.(CIIDIR)
Dra. Ana María Ibarra Humphries	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR)
Dra. Silvia Alejandra García Gasca	Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD)

### **JURADO DE EXAMEN DE GRADO**

Dr. Francisco Javier Magallón Barajas	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR)
Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR)
Dr. Cesar Marcial Escobedo Bonilla	Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional. (CIIDIR)
Dra. Ana María Ibarra Humphries	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR)
Dra. Silvia Alejandra García Gasca	Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD)
Dr. Ángel Isidro Campa Córdova (Suplente)	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR)
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle (Suplente)	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR)

## Resumen

El virus de la mancha blanca (WSSV) sigue siendo la principal amenaza para los cultivos de camarón en todo el mundo. Hasta el momento el RNA de interferencia (RNAi) dirigido al bloqueo de genes virales, es la herramienta antiviral más efectiva para contrarrestar su efecto. El RNAi es un mecanismo celular que se inicia cuando un RNA de doble cadena (dsRNA) largo, es procesado a RNAs pequeños que se incorporan a complejos efectores de silenciamiento y son guiados a secuencias complementarias blanco en el RNA mensajero (mRNA) para degradarlo de manera específica. Sin embargo, las evidencias indican que en ausencia de mRNAs objetivo, la potencia del efecto disminuye gradualmente. Una posible solución a este problema es dirigir el silenciamiento a genes endógenos, así, la fuente de mRNAs sería permanente. En este sentido, las proteínas Rab, pequeñas GTPasas que regulan el transporte, acoplamiento y fusión de vesículas durante la endocitosis de partículas, incluyendo al WSSV que utiliza esta vía para infectar las células, es un buen candidato para combatir al virus. El descubrimiento de Rab7 en *Penaeus monodon* (PmRab7) y su silenciamiento, otorga protección contra WSSV en camarones juveniles de *P. monodon* y *Litopenaeus vannamei*. Sin embargo, no hay información sobre la existencia de un homólogo a Rab7 en *L. vannamei* ni del efecto antiviral que provoca su silenciamiento en reproductores de camarón. Además, se desconoce la duración del efecto antiviral y las consecuencias de su silenciamiento para el organismo.

En el presente estudio se aisló y clonó una secuencia homóloga a Rab7 en reproductores de camarón blanco (*L. vannamei*) de México (LvRab7). La secuencia de LvRab7 mostró una homología > 94% con las de otras especies de camarones. El silenciamiento de LvRab7 mediante dsRNA en reproductores de camarón retrasó la mortalidad cuando los camarones fueron retados contra una dosis viral alta. En contraste, mostró un efecto antiviral potente contra una dosis viral baja y este fue independiente a la cantidad de dsRNA aplicada. Por otra parte, el silenciamiento de LvRab7 fue progresivo y perdurable, pero los camarones tratados, mostraron evidentes signos de deterioro al pasar el tiempo y en algunos casos parece ser letal. Los organismos, presentaron una aparente pérdida de masa muscular y aletargamiento en comparación a los no tratados. Además, hembras reproductoras tratadas con dsRNALvRab7 tuvieron una marcada disminución en su fertilidad.

Los resultados de este estudio sugieren que LvRab7 además de tener una relación con el mecanismo de infección del WSSV, está involucrado con otras funciones vitales de los organismos. Este es el primer reporte de silenciamiento con dsRNA dirigido a un gen endógeno LvRab7 en reproductores de camarón, para contrarrestar el efecto del WSSV. En conclusión, camarones reproductores tratados con dsRNA-LvRab7 mostraron una potente y duradera respuesta antiviral. El silenciamiento perdura, pero puede ser letal a largo plazo. Dado que los reproductores son la fuente de poslarvas que se cultivan en las granjas de camarón, es de vital importancia encontrar estrategias para asegurar la ausencia del WSSV en la progenie. El silenciamiento de genes endógenos de camarón relacionados con la infección de virus parece ser una estrategia promisoría para prevenir infecciones en los laboratorios de producción, pero es necesario evaluar experimentalmente sus consecuencias en los animales antes de ser aplicado a nivel comercial.

Palabras clave: WSSV, Rab7, RNAi

## Abstract

White spot syndrome virus (WSSV) still is the main threat for shrimp culture worldwide. Until now RNA interference (RNAi) directed against viral genes is the most effective antiviral tool against viral infection and its effect. RNAi is a cellular mechanism that begins when a long double-stranded RNA (dsRNA) is processed into small RNAs that are taken up by silencing effectors and are guided to their complementary sequences in the target messenger RNA (mRNA) in order to degrade it in a specific manner. Nonetheless, it is known that in absence of a target mRNA the power of the effect is gradually diminished. A possible solution would be to direct the RNA silencing towards shrimp endogenous genes, so a permanent source of mRNA is achieved.

Rab proteins are small GTPases which regulate the transport, budding and fusion of vesicles during endocytosis of different particles, including viruses that use this pathway during cell infection such as WSSV. Therefore silencing Rab proteins might be a good strategy against virus infection. A Rab7 protein was found in *Penaeus monodon* (PmRab7) and its silencing by RNAi showed protection against WSSV challenge in *P. monodon* and *L. vannamei* juvenile shrimp. Nonetheless, no information is yet available on the presence of a homologous Rab7 protein in *L. vannamei* or its antiviral effect upon silencing in shrimp brooders. Moreover, it is not known the duration of its antiviral effect or the consequences of its silencing inside the animal.

In the present work, a homologous Rab7 sequence was found in Pacific white shrimp (*L. vannamei*) brooders from Mexico (LvRab7). Such a sequence showed a > 94% homology to that of other shrimp species. Silencing LvRab7 by dsRNA in brooders delayed mortality when shrimp were challenged with a high viral dose. In contrast, a potent antiviral effect was observed upon a low viral dose and the effect was dsRNA dose-independent. Moreover, silencing LvRab7 was lasting and progressive but treated shrimp showed clear signs of damage as time post treatment increased and in some cases it could be lethal. Treated animals showed muscle loss and lethargy compared to untreated ones. Moreover, female brooders treated with LvRab7 dsRNA showed a marked reduction in fertility.

The results of this study indicate that LvRab7 has a role in the mechanism of WSSV infection but it is also involved with other vital functions in shrimp. This is the first report of dsRNA silencing directed against an endogenous LvRab7 gene in shrimp brooders in order to inhibit the effect of WSSV.

In conclusion, shrimp brooders treated with LvRab7 dsRNA showed a potent and lasting antiviral response. Although silencing is lasting its effect can be lethal in the long term. Since shrimp brooders are the source of postlarvae used for stocking shrimp farms, it is very important to find strategies to assure WSSV exclusion in these stages. Silencing shrimp endogenous genes involved in virus infection seems to be a promising strategy to prevent virus outbreaks in hatcheries but it remains to evaluate under experimental conditions its effect in the animals before it can be used at a commercial level.

Keywords: WSSV, Rab7, RNAi

## **DEDICATORIA**

Esta tesis está dedicada a las personas más importantes en mi vida:

A mi inseparable esposa Carina Gámez Jiménez

A mi hijo Dorian Azael Alvarez

A mi suegra Guadalupe Jiménez

A mis padres Ma. Lucinda Ruiz y Píndaro Ramón Álvarez

y a mis hermanos Iskander y Yair

## **Agradecimientos**

A Dios. “Gracias amigo, porque a pesar de mis imperfecciones siempre has estado a mi lado”.

De manera muy especial expreso mi agradecimiento a mis asesores de tesis. Dr. Francisco Javier Magallón Barajas, Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz. Dr. Cesar Marcial Escobedo Bonilla, Dra. Ana María Ibarra Humphries y Dra. Silvia Alejandra García Gasca por su paciencia, dedicación y apoyo para sacar adelante esta tesis.

Hago patente mi agradecimiento al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. por permitirme el acceso a todas sus instalaciones y por la excelente formación académica que me dio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico (2010910086) que me dio, sin el cual habría sido casi imposible alcanzar esta meta.

Al Instituto Politécnico Nacional por el permiso para realizar este posgrado.

De manera especial expreso mi agradecimiento al Dr. Jorge Hernández y al M.C. Marco Antonio Porchas Cornejo de las unidades del CIBNOR en Hermosillo y Guaymas por su apoyo incondicional, que me permitieron realizar una parte muy importante de este trabajo.

El desarrollo de este trabajo fue posible gracias a la participación de muchas personas. Agradezco al personal de apoyo a la investigación del CIBNOR:

Al Biol. Hever Latisnere Barragán por su paciencia, amistad y su invaluable apoyo en el trabajo de laboratorio que me permitió concluir con éxito esta meta.

Al Biol. Carlos Ernesto Ceseña por su ayuda en el desarrollo de experimentos en el laboratorio de Nutrición Experimental del CIBNOR.

Al Biol. Diego Alberto Galván Álvarez por su apoyo durante los experimentos que realicé en el CIBNOR de Hermosillo.

A la M.C. Susana Ávila del laboratorio de Genética Molecular por su ayuda durante mi estancia en ese laboratorio.

Y a mis compañeros del Posgrado Amigos entrañables a quienes nunca voy a olvidar. José Antonio Estrada, Coynta Green, Diego Casas, Miguel Jácome, Natalia Trabal, Fito Bogler, Karla Nuño, Lia Medrano.

Y a todas las personas que de alguna forma contribuyeron a la culminación de este trabajo.



## **Contenido**

<b>Introducción</b>	1
<b>Antecedentes</b>	5
Acuicultura	5
Importancia de la Acuicultura en México	5
Camaronicultura	5
Camaronicultura en México	6
Factores de riesgo para la camaronicultura	7
Enfermedades del camarón	7
Principales virus que afectan al camarón	8
<b>Virus de la Mancha Blanca</b>	9
Morfología de WSSV	11
Proteínas estructurales de WSSV	12
Genoma de WSSV	13
Genes tempranos inmediatos de WSSV	16
Genes de WSSV relacionados con latencia	16
Gen anti-apoptosis de WSSV	17
Estrategias contra el virus de la mancha blanca	17
<b>RNA de interferencia (RNAi)</b>	18
El RNAi en camarones	19
El RNAi contra genes virales en camarón	21
Silenciamiento de genes endógenos para contrarrestar virus en camarón	23
<b>Rab 7</b>	24
<b>Endocitosis como mecanismo de entrada de virus a la célula</b>	26
<b>Justificación</b>	29
<b>Objetivo general</b>	33
<b>Objetivos particulares</b>	33
<b>Hipótesis</b>	34
<b>Materiales y métodos</b>	35
Diseño de Oligonucleótidos	35
Extracción de DNA	38
Aislamiento de hemocitos de camarón	38
Extracción de DNA en hemocitos de camarón con DNAzol	38
Extracción de DNA en tejido de camarón con DNAzol	39
Extracción de DNA en hemocitos y tejido de camarón con GENE-CLEAN	39
Análisis de PCR	40
Extracción de RNA	40

Extracción de RNA en hemocitos de camarón	40
Extracción de RNA en tejido de camarón	41
Construcción de cDNA	41
RT-PCR	42
RT-PCR Cuantitativo	42
<b>Aislamiento de <i>Litopenaeus vannamei</i> Rab7 (LvRab7)</b>	44
Síntesis de RNA de doble cadena (dsRNA)	45
Tamaños de RNA de doble cadena para silenciar LvRab7	47
<b>Inóculo viral</b>	48
Titulación <i>in vivo</i> del inóculo de WSSV	48
<b>Evaluación del efecto antiviral mediante RNAi inducido con una secuencia parcial y total de dsRNA-LvRab7 en reproductores de camarón</b>	49
Camarones experimentales	49
Condiciones experimentales	50
Diseño experimental	50
<b>Evaluación del efecto antiviral con diferentes dosis de dsRNA contra diferentes dosis virales.</b>	51
Diseño del experimento	51
<b>Duración del efecto contra WSSV inducido por el silenciamiento de LvRab7 en reproductores de <i>Litopenaeus vannamei</i></b>	53
Camarones experimentales	53
Condiciones experimentales	54
Diseño experimental (Duración del efecto antiviral)	54
<b>Evaluación del efecto contra WSSV al final del periodo reproductivo en hembras reproductoras de <i>L. vannamei</i> que fueron inoculadas con dsRNA-LvRab7 después de la ablación.</b>	55
Obtención de camarones para la reproducción	56
Aclimatación de los reproductores	56
Ablación de las hembras	56
Parchado de las hembras	57
Desove	57
Colecta de huevos	57
Eclosión	58
Desarrollo larvario	59
<b>Diseño experimental [Reto de hembras tratadas después del periodo reproductivo 83 (dpt)]</b>	59
<b>Evaluación de la respuesta antiviral en la progenie de reproductores tratados con dsRNA-Rab7</b>	60
Camarones experimentales	60
Infección intramuscular en la progenie	61
Infección por ruta oral (per-os) en la progenie	62
<b>Caracterización del silenciamiento de LvRab7 en diferentes tejidos de camarón</b>	63
Camarones experimentales	63

Diseño experimental para evaluar el silenciamiento de LvRab7 en diferentes tejidos de camarón	63
<b>Resultados</b>	64
<b>Detección, clonación y secuenciación del gen Rab7 en <i>Litopenaeus vannamei</i></b>	64
<b>Titulación del inóculo de WSSV</b>	66
<b>Efecto antiviral inducido por la inyección de 4µg de dsRNA con una secuencia parcial o la secuencia completa del ORF-LvRab7</b>	67
<b>Efecto antiviral en reproductores de <i>L. vannamei</i> tratados con 4 o 20 µg de dsRNA-LvRab7 y retos contra 25 o 2500 DI de WSSV</b>	69
Expresión de LvRab7 en reproductores tratados con 4 o 20 µg de dsRNA	71
<b>Duración del efecto contra WSSV inducido por el silenciamiento de LvRab7 en reproductores de <i>Litopenaeus vannamei</i></b>	72
Expresión de LvRab7 y WSSV mediante RT-PCR en los camarones tratados con dsRNA-LvRab7 e infectados después de 7, 14 y 21 días post tratamiento	75
<b>Expresión de LvRab7 mediante RT-PCR cuantitativo</b>	76
<b>Resultados en el Laboratorio de Producción de Postlarvas (YAMETO)</b>	78
Registro de desoves colectados de hembras tratadas con dsRNA-LvRab7 y sin tratamiento con dsRNA.	78
Efecto contra WSSV en hembras reproductoras de <i>L. vannamei</i> a 83 días post tratamiento con dsRNA-LvRab7	81
<b>Respuesta de la progenie de hembras de camarón tratadas con dsRNA-LvRab7 ante una infección por el virus de la mancha blanca</b>	82
Infección con WSSV (100 DI) por vía intramuscular en la progenie de hembras tratadas con dsRNA-LvRab7	82
Infección con WSSV por ruta oral en la progenie de hembras tratadas con dsRNA-LvRab7	83
<b>Evaluación del silenciamiento de LvRab7 mediante RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR) en camarones tratados con 4µg de dsRNA</b>	84
Estabilidad de los genes de referencia	85
Expresión relativa de LvRab7 en tres tejidos de camarones tratados con dsRNA-LvRab7	85
<b>Discusión</b>	87
<b>Conclusiones</b>	104
<b>Bibliografía</b>	105
<b>Anexos</b>	126

## Lista de figuras

Figura 1. Producción de camarón cultivado en México de 1994 a 2011 [Fuente: CONAPESCA.SAGARPA ( <a href="http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx">www.conapesca.sagarpa.gob.mx</a> )].	1
Figura 2. Signos del virus de la mancha blanca en camarón blanco ( <i>L. vannamei</i> ). (A) Coloración rojiza de un camarón infectado con WSSV (arriba) camarón sin signos (abajo). (B) Cefalotórax de camarón blanco con inclusiones calcáreas (manchas blancas).	10
Figura 3. Morfología de un virión de WSSV. Micrografía electrónica de contraste negativo de (a) un virión intacto con una extensión de la envoltura en forma de cola. (b) nucleocápside. (c) Diagrama esquemático que muestra las capas que le dan estructura al virión así como las principales proteínas que constituyen estas capas. (Esta figura fue tomada y modificada de Leu et al., 2009).	11
Figura 4. Diagrama esquemático que muestra la organización genómica del genoma circular del virus de la mancha blanca aislado de China. Las posiciones y direcciones de transcripción correspondientes a los genes están indicadas con flechas rellenas. El sitio correspondiente a BamHI corresponde a la posición unodel genoma. (Fuente: Wispovirus de Leu et al., 2009).	14
Figura 5. Oligonucleótidos diseñados en la secuencia de Rab7 en <i>P. monodon</i> . El marco de lectura abierta está coloreado en gris claro. La secuencia y el nombre de los Oligonucleótidos Forward están sombreados de negro y los Oligonucleótidos Reverse de gris oscuro.	25
Figura 6. Posición de Oligonucleótidos utilizados para medir mediante qPCR la expresión del LvRab7. Los Oligonucleótidos fueron diseñados en la secuencia obtenida de camarones reproductores de <i>Litopenaeus vannamei</i> de Sinaloa.	26
Figura 7. Condiciones de amplificación del PCR cuantitativo utilizadas en este estudio.	43
Figura 8. Tanque de maduración y hembras de camarón blanco inoculadas con dsRNA.	57
Figura 9.- tinacos utilizados para el desove de las hembras de camarón y contenedor para recuperar los huevos.	58
Figura 10.- Diseño del bioensayo para retar a las hembras tratadas con dsRNA-LvRab7 contra el virus de la mancha blanca a los 83 días post tratamiento.	60

Figura 11.- Diseño de los bioensayos de reto contra WSSV en la progenie de camarones tratados con dsRNA-LvRab7. Los controles, positivo y negativo fueron camarones provenientes de reproductores sin tratamiento.	62
Figura 12.- Alineamiento y comparación entre las secuencias de Rab7 aisladas de <i>Penaeus monodon</i> (PmRab7), <i>Marsupenaeus japonicus</i> (MjRab7), <i>Litopenaeus vannamei</i> Tailandia (LvRab7) y <i>L. vannamei</i> México (LvRab7 Mex). Las diferencias están señaladas por colores. Una diferencia (gris claro), dos diferencias (gris oscuro) y diferencias entre los dos aislados en <i>L. vannamei</i> (negro).	64
Figura 13. Comparación de la secuencia de aminoácidos de LvRab7 de México con la secuencia de Rab7 en otras especies de camarón y con organismos de otros taxos. Las coincidencias en las secuencias están representadas por una línea continua arriba de las secuencias. Se introdujeron guiones en algunos espacios para alinear mejor las secuencias. Los cinco sitios conservados, característicos de las GTPasas están marcados en cajas grises y los residuos de cisteína en cajas negras.	65
Figura 14. Mortalidad acumulada de reproductores de <i>Litopenaeus vannamei</i> tratados con 4 µg de una secuencia parcial (494 pb) o total (618 pb) de dsRNA-LvRab7 y retos contra WSSV (2500 DI).	68
Figura 15. Mortalidad acumulada de reproductores de <i>Litopenaeus vannamei</i> tratados con 4 o 20 µg de dsRNA-LvRab7 y retos contra una dosis alta de WSSV (2500 DI).	69
Figura 16. Mortalidad acumulada de reproductores de <i>Litopenaeus vannamei</i> tratados con 4 o 20 µg de dsRNA-LvRab7 y retos contra una dosis baja de WSSV (25 DI).	70
Figura 17. Expresión de LvRab7 en hemolinfa de reproductores ( <i>L. vannamei</i> ) tratados con 4 o 20 µg de dsRNA-LvRab7. La expresión corresponde a muestras tomadas de tres organismos a las 24, 72 y 120 horas post tratamiento (hpt). El nivel basal de expresión se obtuvo en muestras colectadas 24 horas antes del tratamiento [(hat) basal]. La expresión de β-actina fue usada como control interno.	71
Figura 18. Mortalidad acumulada de reproductores de <i>Litopenaeus vannamei</i> tratados con 5 µg de dsRNA-LvRab7 y retos contra una dosis baja de WSSV (20 DI) a los siete días post tratamiento.	72
Figura 19. Mortalidad acumulada de reproductores de <i>Litopenaeus vannamei</i> tratados con 5 µg de dsRNA-LvRab7 y retos contra una dosis baja de WSSV (20 DI) a los 14 días post tratamiento.	73

Figura 20. Mortalidad acumulada de reproductores de <i>Litopenaeus vannamei</i> tratados con 5 µg de dsRNA-LvRab7 y retados contra una dosis baja de WSSV (20 DI) a los 2 días post tratamiento.	74
Figura 21. Expresión de LvRab7, β-actina y WSSV-VP28 en tejido branquial de reproductores de <i>L. vannamei</i> . El RNA total correspondiente a las muestras se visualiza en la parte superior. Los niveles de LvRab7 y β-actina se muestran en el medio. La expresión de WSSV-VP28 se muestra en la parte inferior del gel. Muertos (camarones tratados con dsRNA que murieron durante los experimentos), Blanco (camarones sin tratamiento y sin virus), Supervivientes (camarones tratados que sobrevivieron a la infección) y Controles positivos (camarones sin tratamiento e inoculados con WSSV).	76
Figura 22. Expresión relativa de LvRab7 estimada en tejido branquial de reproductores ( <i>L. vannamei</i> ) experimentales. Las muestras fueron divididas en grupos de cinco animales. Control positivo (Sin dsRNA + WSSV). Blanco (Sin dsRNA y sin virus). Supervivientes (Camarones supervivientes de los retos a 7, 14 o 21 dpi). Muertos (Camarones que murieron durante los experimentos). La expresión de LvRab7 fue normalizada contra los genes 40S-S24, Factor de elongación y Ubiquitina. Las letras diferentes arriba de las barras indican diferencia entre grupos con 95% de confianza.	77
Figura 23. Expresión relativa de LvRab7 de reproductores de <i>L. vannamei</i> supervivientes y blancos de los experimentos de reto a los 7, 14 o 21 dpt. La expresión fue normalizada contra tres genes de referencia (40S-S24, Factor de elongación y Ubiquitina).	78
Figura 24. Número de nauplios por hembra obtenidos a los 12 y 22 dpt de las hembras tratadas con dsRNA-LvRab7 y del control negativo (sin dsRNA).	79
Figura 25.- Huevos y nauplios de las hembras bloqueadas con dsRNA-LvRab7, dsRNA-VP89 y las hembras no bloqueadas (control).	80
Figura 26. Mortalidad acumulada de hembras reproductoras de <i>Litopenaeus vannamei</i> tratadas con 4 µg de dsRNA-LvRab7 y retados contra WSSV 83 días después del tratamiento.	81
Figura 27. Mortalidad acumulada en la progenie de hembras reproductoras de <i>Litopenaeus vannamei</i> tratadas con 4 µg de dsRNA-LvRab7 y retada contra 100 Dosis Infecciosas de WSSV suministradas por vía intramuscular.	82
Figura 28. Mortalidad acumulada en la progenie de hembras reproductoras de <i>Litopenaeus vannamei</i> tratadas con 4 µg de dsRNA-LvRab7 y retada contra WSSV por vía oral con tejido infectado como alimento.	83

- Figura 29. Expresión relativa de LvRab7 en hemocitos de camarones tratados con dsRNALvRab7 y sin tratamiento (control). Las muestras fueron colectadas a diferentes tiempos post tratamiento (2, 7, 14 y 21 días). 85
- Figura 30. Expresión relativa de LvRab7 en tejido branquial de camarones tratados con dsRNALvRab7 y sin tratamiento (control). Las muestras fueron colectadas a diferentes tiempos post tratamiento (2, 7, 14 y 21 días). 86
- Figura 31. Expresión relativa de LvRab7 en pleópodos de camarones tratados con dsRNALvRab7 y sin tratamiento (control). Las muestras fueron colectadas a diferentes tiempos post tratamiento (2, 7, 14 y 21 días). 86

## Lista de Tablas

Tabla I. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.	27
Tabla II. Diseño experimental para comparar del efecto contra WSSV de dos fragmentos de dsRNA de diferente tamaño.	51
Tabla III. Diseño experimental para evaluar el efecto antiviral de dos dosis de dsRNA-LvRab7 contra una dosis alta y una baja del virus de la mancha blanca.	52
Tabla IV. Diseño experimental para evaluar la duración del efecto contra WSSV inducido mediante el silenciamiento de LvRab7 en reproductores de <i>L. vannamei</i> .	55
Tabla V. Resultados de mortalidad y supervivencia de cinco camarones por dilución, inyectados con 100 µl de cada dilución del inóculo original.	66
Tabla VI. Número de hembras colectadas para desovar a los 12 y 22 días post tratamiento y número de nauplios obtenidos en los desoves.	79
Tabla VII. Eficiencia de la reacción de qPCR con Oligonucleótidos que amplificaron genes de referencia y LvRab7 utilizados en este estudio (E), linealidad de la curva estándar (R), ciclo de intersección del umbral (Cq) y cantidad de Oligonucleótidos utilizados en cada reacción.	84



## Introducción

Los camarones, desde hace mucho tiempo han sido considerados una exquisitez culinaria en todo el mundo. Su gran demanda ha promovido la producción de este crustáceo por medio del cultivo en diversos países del mundo. En México, la producción de camarón cultivado tuvo un aumento significativo de 1994 al 2009 del orden de diez mil hasta más de cien mil toneladas al año con un declive en 2010 y 2011 (Figura 1).



Figura 1. Producción de camarón cultivado en México de 1994 a 2011 [Fuente: CONAPESCA.SAGARPA ([www.conapesca.sagarpa.gob.mx](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx))]

Desafortunadamente, en los estados pioneros de esta actividad, el crecimiento se dio de manera anárquica y carente de estudios de impacto ambiental y de la hidrografía de las zonas. Este crecimiento no planeado ha propiciado la aparición y dispersión de brotes infecciosos, y aunque en los últimos años las nuevas granjas acuícolas fueron planeadas fuera de zonas críticas de riesgo, esto no ha sido suficiente para contener su dispersión.

Desde que la camaronicultura se intensificó en México y en todo el mundo, surgieron enfermedades infecciosas que han afectado al camarón. Dentro de estas enfermedades, históricamente las de origen viral han sido las de mayor impacto en la industria.

El virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV, “White Spot Syndrome Virus” por sus siglas en inglés) es hasta el momento el patógeno viral causante de la enfermedad más

devastadora de la que se tenga registro en cultivos de camarón (Inouye et al., 1994; Wongteerasupayal et al., 1995). Este virus se ha detectado en una gran variedad de hospedantes alternos, principalmente crustáceos, y su alta patogenicidad en camarones peneidos representa un peligro latente para la camaronicultura. Desde su aparición en Taiwán en 1992 (Chou et al., 1995) hasta el año 2003, las pérdidas acumuladas habían rebasado los siete mil millones de dólares (Escobedo-Bonilla et al., 2008). Altamente contagioso, el WSSV llegó a América a mediados de los 90s. Algunos reportes indican que la mortalidad acumulada en estanques de cultivo puede alcanzar el 100% de la población en tres a diez días después de la aparición de los signos clínicos (Lightner, 1996). En los estanques, los camarones infectados nadan lentamente de forma errática cerca de la superficie y eventualmente se van al fondo y mueren (Durand et al., 1997; Lightner, 1996). Se han evaluado varias estrategias contra el WSSV que incluyen vacunas recombinantes (Wittevelt et al., 2004), probióticos y algas (Balasubramian et al., 2006), extractos de plantas (Peraza-Gómez et al., 2009), manipulación de temperaturas (Rahman et al., 2006b) y RNA de interferencia (RNAi por sus siglas en inglés) que incluye RNAs pequeños de interferencia (siRNA por sus siglas en inglés) y RNA largos de doble cadena (dsRNA por sus siglas en inglés) (Robalino et al., 2005; Kim et al., 2007).

Hasta el momento, el RNAi parece ser la herramienta antiviral más efectiva. El RNAi es un mecanismo celular que se inicia cuando un dsRNA largo es procesado a RNAs pequeños (21 a 26 pb) mediante una RNasa III (Dicer). Estos RNA pequeños se incorporan a complejos efectores de silenciamiento, que son guiados a secuencias complementarias blanco en el RNA mensajero (mRNA por sus siglas en inglés) con lo que se inicia la degradación específica de éstos (Fire et al., 1998).

Este fenómeno ha sido descrito en diversas especies de camarón, así como en un gran número de organismos eucariontes (Tirasophon et al., 2007; Xu et al., 2007; Rijiravanich et al., 2008). El RNAi ha mostrado un efecto importante contra WSSV en diversas especies de camarones como *Marsupenaeus japonicus* (Wu et al., 2007; Xu et al., 2007; Sudhakaran et al., 2011), *Penaeus chinensis* (Kim et al., 2007), *Penaeus monodon* (Westenberg et al., 2009) y *Litopenaeus vannamei* (Robalino et al., 2005; Wu et al., 2007).

Los estudios reportados indican que la eficacia del RNAi para inhibir la replicación de WSSV en camarones depende del tamaño del dsRNA, de la dosis, de la carga viral así como de la proteína silenciada (Robalino et al., 2005; Tirasophon et al., 2005; Wu et al., 2007). Además, algunos resultados sugieren que en RNAi necesita estar en presencia de mRNAs objetivo para reactivarse (Sijen et al., 2007).

Por otra parte, se sabe que el silenciamiento de algunos genes endógenos de camarón pueden producir un efecto antiviral. Por ejemplo: el silenciamiento de  $\beta$ -integrina en *Marsupenaeus japonicus* (Li et al., 2007), Caspasa-3 en *Litopenaeus vannamei* (Rijiravanich et al., 2008) y FcTetraspanin-3 en *Fenneropenaeus chinensis* (Gui et al., 2012) mostraron una importante disminución en la replicación del virus de la mancha blanca en infecciones experimentales. Además, en 2006 se describió una pequeña Rab-GTPasa en *P. monodon* (PmRab7) (Sritunyalucksana et al., 2006) cuyo silenciamiento mediante RNAi produjo un efecto contra WSSV en juveniles y postlarvas de camarón (Ongvarrasopone et al., 2008; Attasart et al., 2009).

Las proteínas Rab (Ras-associated binding) son pequeñas GTPasas que regulan el transporte acoplamiento y fusión de vesículas en los mecanismos de endocitosis y exocitosis (Rodman y Wandinger-Ness, 2000).

Numerosas familias de virus utilizan el mecanismo de endocitosis y a las proteínas Rab para entrar e infectar las células. Por ejemplo, Virus de la encefalitis equina de Venezuela (VEEV) y el virus del dengue (DENV) requieren Rab5 y Rab7 para infectar mediante endocitosis las células del hospedero (Colpittset al., 2007; van der Schaar et al., 2008)

En el mismo sentido, en camarones se han realizado estudios para conocer la relación de Rab7 en el proceso de infección de WSSV en juveniles y postlarvas de *P. monodon* (Ongvarrasopone et al., 2008; Attasart et al., 2009). La inyección de dsRNA contra Rab7 disminuyó el número de mRNA a las 48 horas post tratamiento (hpt) y al infectar en ese tiempo se logró incrementar la supervivencia de camarones juveniles y postlarvas (Ongvarrasopone et al., 2008; Attasart et al., 2009). Tales resultados sugieren que PmRab7 es un factor celular requerido para la replicación de WSSV en *P. monodon*.

A la fecha, no hay información disponible acerca de Rab7 en reproductores de camarón blanco ni del efecto de su silenciamiento contra el virus de la mancha blanca.

Dado que los reproductores de camarón confinados en los criaderos son la fuente de postlarvas que se siembran en las granjas de México, es de gran utilidad conocer el efecto del silenciamiento de Rab7 para implementarse como medida contra WSSV inducido mediante RNAi, para reducir el riesgo de transmisión a la progenie. Por lo anterior, en el presente estudio se realizó una investigación para detectar la presencia de un homólogo de PmRab7 en reproductores de *L. vannamei* y se evaluó el efecto antiviral de su silenciamiento bajo diferentes condiciones experimentales.

El RNAi podría ser un tratamiento preventivo muy efectivo contra el WSSV en los laboratorios de producción de postlarvas. Los resultados obtenidos en la presente investigación proveen una mejor comprensión del sistema de RNAi en camarones y permiten determinar si el silenciamiento de genes endógenos puede ser una estrategia viable contra el virus de la mancha blanca para ser aplicada a nivel comercial.

## **Antecedentes**

### **Acuicultura**

La acuicultura se define como “La técnica para incrementar la producción de plantas y animales acuáticos mediante su crianza en un área determinada”. Esta actividad tiene como objetivo fundamental, la producción de especies de agua dulce, salobre o marina (como crustáceos, peces, moluscos y algas) por medio de la manipulación de ambientes acuáticos naturales o artificiales.

En el mundo un cuarto del total de la proteína animal consumida por el hombre es de origen acuático (Bocek, 2004). En 2004 había poco más de seis mil millones de habitantes y hoy en día hay más de siete mil millones, por lo que en los últimos años varios países africanos y latinoamericanos han incrementado la producción de especies acuícolas.

### **Importancia de la Acuicultura en México**

En la actualidad, México es considerado un país con gran potencial de desarrollo acuícola debido al clima, recursos naturales y especies nativas con potencial de cultivo. La acuicultura en México se ha desarrollado en todas las regiones del país, mediante diversas técnicas de cultivo desde extensivas con sistemas abiertos o cerrados, hasta intensivas y semi-intensivas, en jaulas, encierros, líneas suspendidas, estanques artesanales de tierra, canales de corriente rápida, estanques de concreto, cubiertas plásticas y otras tecnologías disponibles para criar especies acuáticas (SEMARNAT, 2005).

Los principales estados en donde se desarrolla la acuicultura son Sinaloa, Sonora, Nayarit, Tamaulipas y Yucatán. Por otra parte, aunque existen cultivos de diversas especies de moluscos y peces, el camarón es la especie más cultivada, principalmente en el Pacífico donde se produce el 95% de la producción nacional (De Walt, 2000).

### **Camaronicultura**

En 1980, el 98% de la oferta mundial de camarón era de origen silvestre y el resto era cultivado en granjas. Sin embargo, con el aumento de la demanda, principalmente en los países desarrollados, la camaronicultura fue objeto de un gran desarrollo desde entonces y

hasta la fecha. Por su volumen de producción, el camarón blanco (*L. vannamei*) es la especie de crustáceo marino que se ha introducido con mayor éxito a nivel internacional en la acuicultura. En 2010 representó el 71.8% de la producción mundial de todas las especies de camarón marino cultivado (FAO 2012).

Actualmente, el camarón continúa como el principal producto acuícola en cuanto a valor se refiere, con el 15% del valor total de los productos pesqueros comercializados internacionalmente. El valor del camarón tuvo un aumento anual desde la década de los 80s hasta 2009 donde su valor experimentó por primera vez una disminución debida a la crisis mundial (FAO 2010)

Dentro de los principales países productores de camarón en el mundo se encuentran: Ecuador, Tailandia, Indonesia, China, India y México. Por lo que en 2002 estos siete países suplieron más del 75% de la producción mundial de camarones cultivados (FAO, 2002).

### **Camaronicultura en México**

El cultivo de camarón en México se lleva a cabo en Sonora, Sinaloa y Nayarit principalmente. En estos tres estados se concentra el 95% de las granjas que existen en nuestro país. Aunque en la actualidad es difícil establecer fronteras entre los distintos sistemas de engorda, tradicionalmente se ha hablado de cuatro que son básicos: extensivo, semintensivo, intensivo e hiperintensivo. Sin embargo, puede haber varios puntos intermedios entre ellos. Básicamente los parámetros que caracterizan a un sistema determinado son: la densidad de siembra que se maneja, el control que se ejerce sobre la producción (alimento, fertilización, recambio de agua, aireación, y control ambiental, entre otros) el tipo de infraestructura utilizado, los rendimientos obtenidos y el impacto que la actividad ejerce sobre los ecosistemas aledaños (Pillay, 2004).

Actualmente existen más de 25 especies de camarones que se cultivan a nivel comercial, piloto o experimental, pero en realidad se considera que hay muchas otras que son potencialmente explotadas para este propósito. Para la selección de una especie en particular, se deben tomar en cuenta diferentes aspectos como su biología, mercado y el sector social que se ocupará de su mantenimiento. Finalmente, estos aspectos, repercuten significativamente en el éxito o fracaso de su cultivo.

### **Factores de riesgo para la camaronicultura**

Como en todos los cultivos de organismos vivos, la camaronicultura enfrentan ciertos riesgos, los cuales se pueden dividir en factores bióticos y abióticos. Ambos están directa o indirectamente relacionados con el desarrollo de los camarones.

Las variables abióticas son parámetros independientes a la actividad biológica de los organismos pero que finalmente están ligadas con su crecimiento. Van desde el lugar físico de ubicación de la granja, el tipo y características del suelo, el cual debido a los hábitos bentónicos de la especie, actúa como sustrato de soporte del cultivo (Musiri et al., 1996).

Las características meteorológicas propias de la región, como lluvias, tormentas, huracanes, y ciclones, entre otros eventos ambientales han ocasionado descensos considerables en la producción de camarón, debido a que generan cambios bruscos en los parámetros físico-químicos del agua en los estanques de cultivo (Peinado-Guevara y López-Meyer, 2006).

Por otra parte, algunas variables bióticas son la calidad de las postlarvas usadas en el cultivo, el alimento suministrado, el alimento natural en el estanque y las prácticas de manejo (Goddard, 1996). Sin embargo, el problema más importante que se ha presentado en los cultivos de camarón es la aparición de enfermedades. Al incrementarse las densidades de siembra en cultivos de camarón, surgieron múltiples problemas patológicos que han influido en el desarrollo de esta actividad. Las enfermedades que afectan al camarón blanco (*L. vannamei*) se pueden dividir en dos grupos: las no infecciosas (de tipo tóxico o nutricional) y las infecciosas producidas por bacterias, hongos, protozoarios o virus (Páez-Osuna, 2001).

### **Enfermedades del camarón**

En las granjas de cultivo intensivo de camarón, los manejos sanitarios deficientes y la excesiva presión a los ecosistemas, han favorecido la diseminación de patógenos y la incidencia de enfermedades infecciosas.

Sin duda alguna los parámetros físico-químicos son cruciales para la manifestación de las enfermedades en el camarón, ya que los cambios repentinos en la salinidad, temperatura, oxígeno disuelto, entre otros, estresan al crustáceo y provocan un efecto de

inmunosupresión, el cual puede ser aprovechado por patógenos oportunistas (Páez-Osuna, 2001; Peinado-Guevara y López-Meyer, 2006).

Dentro de las enfermedades de importancia económica en camarón se encuentran las originadas por bacterias, hongos, protozoarios parásitos y virus. Las enfermedades producidas por virus, son la principal causa de pérdidas económicas para los productores de camarón cultivado en todo el mundo. Se han registrado alrededor de 20 virus que afectan a los camarones en cultivo y en el medio natural a nivel mundial (Lightner y Redman, 1998) y el número sigue en aumento.

En la década de los 90s hubo una reducción en la producción de camarón en Asia (FAO), esto a pesar de que la superficie de cultivo se incrementó. Este descenso en la producción estuvo relacionado con el reporte de muertes masivas ocasionadas por virus en los estanques de camarón (Lotz, 1997).

Aunque existen más de 20 virus que afectan al camarón, cuatro de ellos han impactado de manera importante a la industria acuícola y se consideran de alto riesgo: YHV (Yellow Head Virus), WSSV (White Spot Syndrome Virus), IHHNV (Infectious Hematopoyetic Hypodermic Necrosis Virus) y TSV (Taura Syndrome Virus).

### **Principales virus que afectan al camarón**

Al menos cuatro virus han causado pandemias y afectado adversamente a la industria del cultivo de camarón en todo el mundo desde 1980. En orden de su descubrimiento son el Virus de la Necrosis Infecciosa Hipodermal Hematopoyética (IHHNV) que recientemente fue renombrado como *Penaeus Stylirostris* Densovirus (PstDNV), Virus de la cabeza amarilla (YHV), Virus del Síndrome de Taura (TSV) y el Virus de la Mancha Blanca (WSSV) (Lightner, 1999). El impacto socioeconómico causado por estos virus ha sido muy severo en algunos países de Asia y del oeste de América, a tal grado de ser etiquetados por la Oficina Internacional de Epizootias OIE como una amenaza para los crustáceos de cultivo y silvestres de todo el mundo por la movilización de productos frescos o congelados provenientes de estas regiones.

En América, IHHNV, TSV y WSSV han sido los que han tenido un mayor impacto en los cultivos de camarón (Bonami et al., 1990; Bonami et al., 1997; Escobedo-Bonilla et al.,



2008). Además, se ha reportado la presencia de YHV (Sánchez-Barajas et al., 2009). Por tal motivo, YHV es considerado una seria amenaza para los camarones del continente americano, ya que en infecciones experimentales se ha demostrado que los camarones de América son altamente susceptibles a este virus (Cedano-Thomas et al., 2010).

Actualmente, han aparecido nuevas enfermedades adjudicadas a virus que afectan al camarón. Por ejemplo, la infección por Mionecrosis que apareció en Brasil en 2003 resultó ser producida por el Virus de la Mionecrosis (IMNV) (Lightner et al., 2004).

De estos, el virus de la mancha blanca es hasta el momento el patógeno más devastador que afecta camarones peneidos (Lightner, 1996; Flegel, 1997).

### **Virus de la Mancha Blanca**

De todos los virus que afectan al camarón, el virus de la mancha blanca (WSSV) es el que ha tenido el mayor impacto en los cultivos de camarón hasta ahora (Escobedo-Bonilla et al., 2008; Lightner, 2011). La enfermedad de la mancha blanca (WSD) causa mortalidades masivas en pocos días después de su aparición, por lo que es una seria amenaza para la acuicultura del camarón (Lightner, 1996). Los signos clínicos incluyen, manchas blancas en el lado externo del exoesqueleto (aunque en camarón blanco no son muy evidentes), letargia, nado de costado y una coloración de rosa a café-rojiza (Figura 2). Además se caracteriza por una rápida reducción en el consumo de alimento y una notable expansión de los cromatóforos (Morales-Covarrubias y Chávez-Sánchez, 1999).

WSSV puede ser transmitido de manera horizontal cuando un individuo infectado muere y es canibalizado por los que se encuentran a su alrededor. Por eso, la dispersión es más eficiente y severa cuando la densidad de organismos es alta. Otra manera de transmisión horizontal es a través de las branquias u otras superficies del cuerpo que están expuestas a partículas virales en el agua (Esparza-Leal et al., 2009). También se ha visto que se puede transmitir de los reproductores a la progenie. Sin embargo, es más probable que esta infección se dé por la contaminación externa de los huevos y no porque los ovocitos o el esperma contengan partículas virales (Lo et al., 1997).

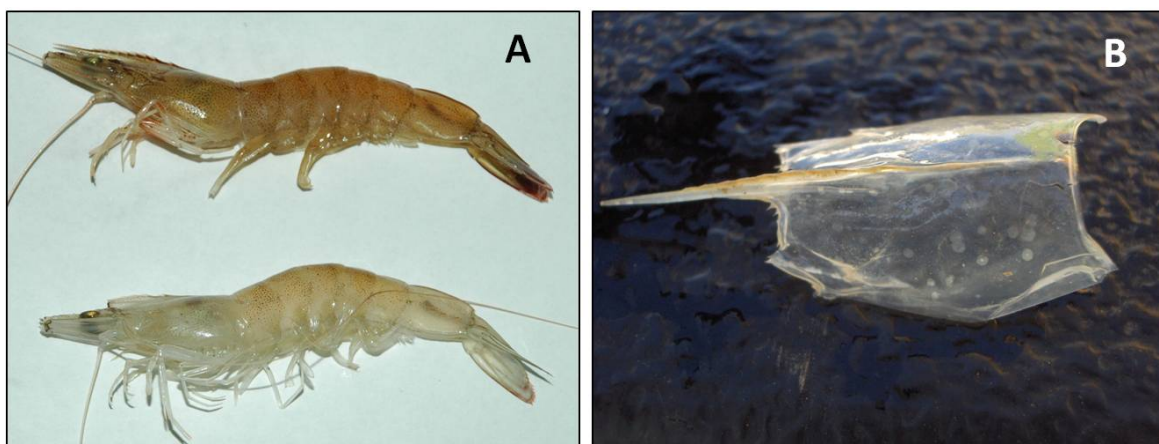


Figura 2. Signos del virus de la mancha blanca en camarón blanco (*L. vannamei*). (A) Coloración rojiza de un camarón infectado con WSSV (arriba) camarón sin signos (abajo). (B) Cefalotórax de camarón blanco con inclusiones calcáreas (manchas blancas).

Aunque los camarones peneidos son muy susceptibles a WSSV, algunos estudios indican que las postlarvas presentan una mayor resistencia al virus (Venegas et al., 1999; Yoganandhan et al., 2003). Aunque la enfermedad no es evidente en postlarvas, si se logra detectar el virus mediante PCR anidado. Además, cuando las postlarvas entran en su fase juvenil sobrevienen mortalidades importantes (Ayub et al., 2008; Leu et al., 2009). La resistencia relativa de las postlarvas podría deberse a su rápido desarrollo, a sus procesos metabólicos y al desarrollo incompleto de los órganos blanco para el virus (Venegas et al., 1999). Por otra parte, se ha visto que algunos crustáceos como el langostino (*Macrobrachium rosenbergii*) presentan una susceptibilidad mayor en estadios larvales que disminuye conforme el animal aumenta de talla (Pramod Kiran et al., 2002).

WSSV tiene un rango de hospederos muy amplio, y puede infectar varias especies de crustáceos de agua salobre y de agua dulce, como cangrejos, jaibas, langostas, cangrejos ermitaños y casi todas las especies de camarones peneidos son susceptibles a WSSV (Lo et al., 1996). Al contrario que en los camarones de cultivo, frecuentemente la infección en otras especies de crustáceos silvestres no es letal, por lo tanto, estas pueden servir como reservorios del virus. Aunque la infección de crustáceos silvestres ocurre, hasta el momento no hay evidencia de que el virus cause mortalidades importantes en estas poblaciones. Finalmente, algunos copépodos colectados de granjas infectadas con WSSV, así como postlarvas silvestres que ingresan por el bombeo han sido diagnosticados como positivos

por PCR, por lo que estos animales pueden ser acarreadores del virus de afuera de las granjas hacia los estanques (Ramirez-Douriet, 2005).

### Morfología de WSSV

El virión de WSSV tiene forma ovoide con un extremo ligeramente más ancho que el otro. Mide de 80-120 nm de ancho por 250-380 nm de largo (OIE 2003) (Figura 3 a). Algunos viriones tienen un apéndice (con apariencia de cola o flagelo) en el extremo más estrecho (Figura 3 c) (Wang et al., 1995; Wongteerasupaya et al., 1995). Esta cola puede ser una extensión de la envoltura que mide de 270-310 nm (Durand et al., 1996). La nucleocápside no envuelta tiene forma de barra de 330-350 x 58-67 nm, que son más largas y más delgadas que las partículas virales intactas (Wang et al., 1995). La nucleocápside tiene una apariencia superficial segmentada (Figura 3 b). Una nucleocápside intacta, usualmente tiene de 14-19 segmentos. Estos segmentos son como anillos, por lo que la nucleocápside parece estar formada por una serie de anillos unidos entre sí (Wang et al., 1995; Durand et al., 1997; Huang et al., 2001)

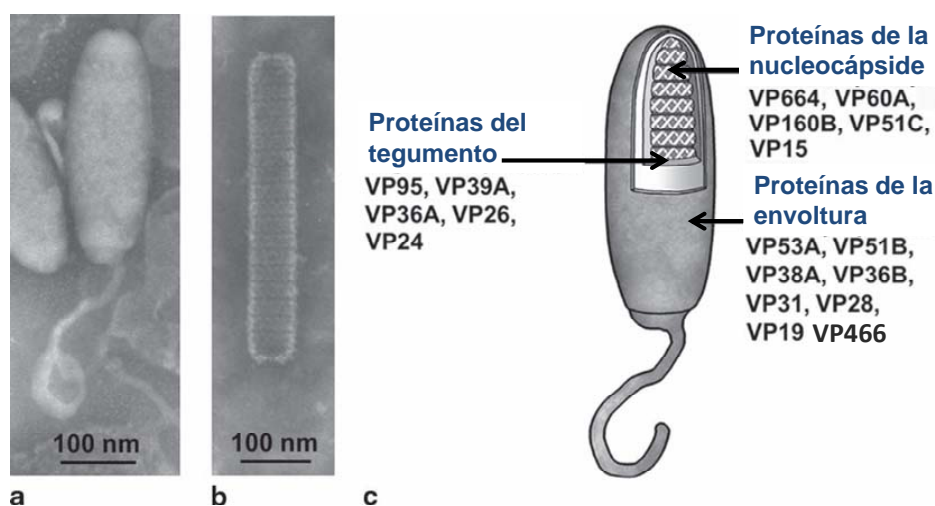


Figura 3. Morfología de un virión de WSSV. Micrografía electrónica de contraste negativo de (a) un virión intacto con una extensión de la envoltura en forma de cola. (b) nucleocápside. (c) Diagrama esquemático que muestra las capas que le dan estructura al virión así como las principales proteínas que constituyen estas capas. (Esta figura fue tomada y modificada de Leu et al., 2009)

### **Proteínas estructurales de WSSV**

En un inicio, debido a la mala calidad y baja cantidad de viriones aislados de hemolinfa o tejido epitelial sólo se lograron identificar a tres proteínas estructurales (VP28, VP26 y VP24) (van Hulten et al., 2000 a y b). Posteriormente, se descubrió que cangrejos de río (*Procamabarus clarkii*) pueden resistir mejor el virus que los camarones peneidos y contener cargas virales más elevadas de virus en hemolinfa. Gracias a esto se lograron extraer cantidades mayores de viriones para identificar nuevas proteínas (Huang et al., 2001). Después de que el genoma de WSSV fuera secuenciado y con las nuevas tecnologías en proteómica, secuenciar las proteínas estructurales fue más sencillo. Gracias a estos avances, se han identificado más de 40 proteínas de diferentes tamaños, que van desde 68 hasta 6077 aminoácidos (Huang et al., 2002; Zhang et al., 2004; Tsai et al., 2004; Xie et al., 2006). Dentro de estas, las principales proteínas de WSSV son VP664, VP28, VP26, VP24, VP19 y VP15. Aunque la función biológica de estas todavía no está bien caracterizada.

Algunas de estas proteínas estructurales constituyen la envoltura del virus, por lo tanto podrían estar involucradas en el ensamblaje y entrada del virus a la célula (Chazal y Gerlier, 2003). La proteína VP28 es la más abundante en la envoltura del WSSV. Su bloqueo mediante un anticuerpo (anti-VP28) neutralizó la infectividad del virus, por lo tanto, se dedujo que juega un papel importante en la infección sistémica (van Hulten et al., 2001b). Al menos tres proteínas de membrana pueden interactuar con VP28. Una de ellas es Rab7 (Sritunyalucksana et al., 2006). Rab7 es una pequeña proteína de unión GTP cuya principal función en células de mamíferos es la de endocitosis y exocitosis. La relación con WSSV se determinó al aplicar anticuerpos anti-Rab7 en camarones y retándolos contra WSSV. Los camarones tratados sobrevivieron, por lo que se demostró que Rab7 está relacionada con el proceso de infección del virus (Sritunyalucksana et al., 2006). Por otra parte, VP28 también interactúa con proteínas virales como VP26 y VP24 (Xie et al., 2006). Curiosamente, estas tres proteínas tienen varias regiones conservadas entre sí, lo que sugiere que provienen de un ancestro común. Sin embargo, durante su replicación genética divergieron con funciones estructurales diferentes (van Hulten, 2000a).

La proteína VP15 de WSSV se une al DNA viral, por lo tanto se cree que está envuelta en la condensación y empaquetamiento del genoma de WSSV en la nucleocápside (Zhang et al., 2001; van Hulten et al., 2002).

La VP664 es otra proteína de la nucleocápside, considerada la proteína viral más grande de la que se tenga reporte. Consiste en un marco de lectura abierta de 18,234 bases que codifican un polipéptido de 6,077 aminoácidos con un peso molecular de 664 kDa (por esto es llamada VP664). Esta proteína forma la estructura de anillos que se ven en la nucleocápside con microscopía electrónica (Leu et al., 2005).

Con respecto al tegumento de WSSV, parece que la proteína VP26 interactúa con actina (Xie y Yang, 2005). La actina está reconocida como un factor importante en el ciclo de vida de muchos virus, especialmente en la entrada a la célula mediante sitios de reconocimiento que los internalizan, así como en el ensamble y salida de la progenie viral (Radtke et al., 2006). Cuando se descubrió que VP26 recombinante se une a la nucleocápside, se dedujo que después de la fusión y desnudamiento, la nucleocápside podría usar VP26 para unirse a actina y así viajar por los filamentos de actina hacia el núcleo (Xie y Yang, 2005). El motivo Arg-Gly-Asp (RGD) es conocido por interactuar con integrinas, y muchos virus usan este motivo para unirse a integrinas en la superficie de la célula del hospedero, capacitándolos para entrar. Aunque al menos seis proteínas estructurales de WSSV contienen este motivo, hasta el momento no se ha reportado que péptidos sintéticos de RGD afecten la infectividad de los viriones de WSSV (Li et al., 2006).

En resumen, se han identificado varias proteínas estructurales de WSSV. Sin embargo, todavía hacen falta estudios para determinar cómo interactúan entre ellas y con otras proteínas para ensamblar el virión y cómo interactúan con otras proteínas dentro de la célula infectada.

### **Genoma de WSSV**

El genoma de WSSV consiste en una molécula de DNA de doble cadena en forma circular de aproximadamente 300 Kpb (Figura 4). Hasta el momento se han reportado tres secuencias de su genoma completo: el de China (clave de acceso en GenBank AF332093), Tailandia (Clave de acceso en Gene Bank AF369029) y Taiwan (clave de acceso en

GenBank AF440570). El tamaño de sus secuencias es 305, 297 y 307 Kpb respectivamente. El porcentaje de G C del genoma completo es de 41% aproximadamente y están distribuidas uniformemente en el genoma (van Hulten et al., 2001b; Yang et al., 2001). Aunque cada una de las secuencias genómicas de WSSV tiene su propia nomenclatura para sus genes u ORFs (del inglés Open Reading Frame o Marco de Lectura Abierta), el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) seleccionó al aislado de China como oficial (Figura 4).

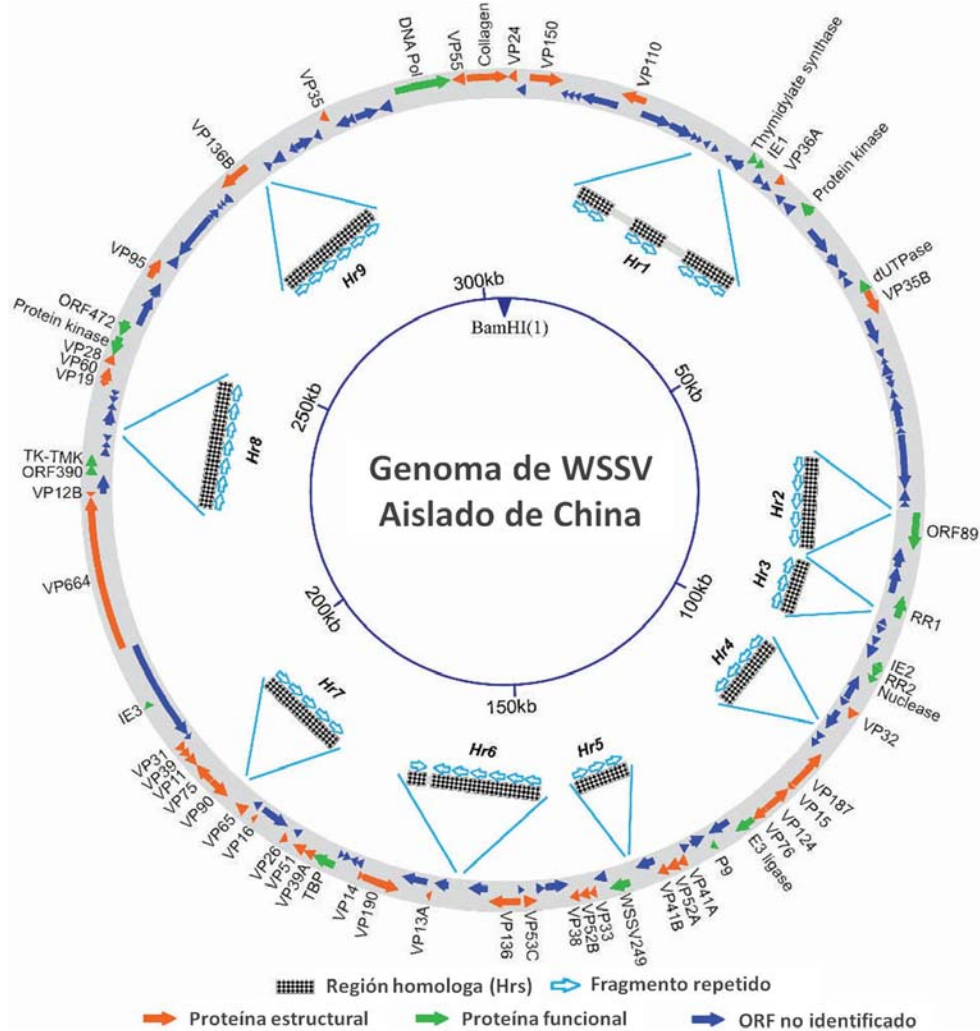


Figura 4. Diagrama esquemático que muestra la organización genómica del genoma circular del virus de la mancha blanca aislado de China. Las posiciones y direcciones de transcripción correspondientes a los genes están indicadas con flechas rellenas. El sitio correspondiente a BamHI corresponde a la posición unodel genoma. (Fuente: Wispovirus de Leu et al., 2009).

Algunas de las secuencias del genoma son únicas mientras que sólo el 3% consiste en secuencias repetitivas. Estas secuencias repetidas están organizadas en nueve regiones homólogas distribuidas en el genoma, pero están localizadas principalmente en regiones intergénicas. Las regiones homólogas contienen 47 mini-fragmentos repetidos, que incluyen repeticiones directas, secuencias atípicas repetidas pero invertidas y secuencias palíndromes imperfectas.

Muchos genomas de los baculovirus contienen regiones homólogas, que funcionan como potenciadores de la transcripción de genes tempranos y como sitios de iniciación de la replicación del DNA, por eso los baculovirus son altamente infectivos. Aunque la organización de regiones homólogas de WSSV es similar al encontrado en baculovirus, sus funciones no han sido determinadas. Sin embargo, al menos una proteína (WSV021) de un gen temprano se une a las regiones homólogas *in-vitro* (Zhu et al., 2007).

El análisis de secuencia identificó 531 ORFs putativos que contienen al menos 60 codones en el aislado de China. Aproximadamente una tercera parte (181 ORFs) no está traslapada y aproximadamente un 80% de estos tienen un sitio potencial de adenilación tipo (AATAAA) Río abajo del ORF. Sólo el 45 % de los ORFs no traslapados codifican proteínas con más de 20% de homología a proteínas conocidas (Yang et al., 2001). Por otro lado, algunos ORFs codifican proteínas que tienen 40% o más de homología con otras y que pueden ser clasificadas en la misma familia de genes. Sólo 27 ORFs pueden ser clasificados como genes putativos de WSSV y se ha propuesto que son resultado de la duplicación del genoma de WSSV (van Hulten et al., 2001a).

La comparación de los genomas completos ha mostrado cinco tipos de variaciones genéticas:

1. Una delección grande de 13 Kpb den el genoma de Tailandia con respecto a los aislados de China y Taiwán.
2. Una región genéticamente variable de aproximadamente 750 pb en el aislados de Tailandia.
3. Una secuencia de transposasa con 1,337 pb que se encuentra sólo en el aislado de Taiwán.

4. Variación en el número de unidades de repetición en regiones homólogas y repeticiones directas.
5. Mutaciones de un nucleótido, que incluyen inserciones, deleciones o polimorfismos de un nucleótido.

Si estas variaciones fueran ignoradas, los tres aislados tendrían 99.3 % de homología. En el aislado de china, la región correspondiente a la deleción de 13 Kpb de Tailandia contiene 13 ORFs; esta variación genética ha sido relacionada con diferentes niveles de virulencia de los aislados (Lan et al., 2002). De esta manera, aunque estas regiones no parecen ser importantes para la subsistencia de WSSV, si pueden contener algunos factores relacionados con la virulencia.

### **Genes tempranos inmediatos de WSSV**

Los genes tempranos inmediatos (*ie*) son insensibles a la cicloheximida que generalmente inhibe la síntesis proteica en organismo eucariotes por lo que basado en esta cualidad, se logró identificar a tres genes tempranos de WSSV: *ie1* (*wsv069*), *ie2* (*wsv178*) y *ie3* (*wsv359*). Después de un escrutinio a gran escala mediante microarreglos con organismos infectados, los análisis de RT-PCR mostraron que los transcritos correspondientes de estos tres genes estuvieron presentes de manera consistente en presencia de cicloheximida (Liu et al., 2005). La proteína codificada por el gen *ie1* está relacionada con la unión al DNA por lo que se piensa que funciona como un factor de transcripción. El papel de los otros dos genes (*ie2* e *ie3*) todavía es un misterio.

### **Genes de WSSV relacionados con latencia**

Mucho es lo que se ha dicho sobre la facultad del virus de la mancha blanca a entrar en latencia. Esto podría explicar porqué los brotes infecciosos desaparecen durante periodos específicos del año para reaparecer de manera generalizada en periodos de tiempo muy cortos. Sin embargo, aunque hay varios estudios relacionados con genes de latencia de WSSV, hasta el momento no se ha logrado inducir esta propiedad de manera experimental. Hasta hoy, se han identificado tres genes de latencia para WSSV (*wsv151*, *wsv427* y



*wsv366*) que fueron aislados de camarones libres de patógenos (SPF) (Khadijah et al., 2003). Cuando la proteína WSV151 fue expresada en células de insecto SF9, se produjo un péptido con masa molecular de 165 kDa y fue localizada en el núcleo. WSSV151 también mostró algún grado de actividad reguladora de genes que reprimen su propia actividad promotora así como la actividad promotora de una proteína-kinasa y la timidina-timidilato-kinasa de WSSV (Hossain et al., 2004). Sin embargo, no se sabe si la represión de WSV151 es directa a estos promotores o si actúa indirectamente mediante otras proteínas de insecto en las células Sf9.

### **Gen anti-apoptosis de WSSV**

Los tejidos de camarón infectados por el WSSV muestran signos característicos de apoptosis como núcleos hipertrofiados, fragmentación de DNA y un incremento en la actividad de caspasa-3 (Wongprasert et al., 2003). Aunque hasta el momento, los factores que inducen la apoptosis son desconocidos. Recientemente se ha identificado una proteína de WSSV anti-apoptosis (ORF390 ó WSV390). La expresión del ORF390 restauró la habilidad de replicación del baculovirus “Autografacalifornica nucleopolyedrovirus” (AcMNPV) deficiente de *p35* (supresor de apoptosis) en células SF-9 (Wang et al., 2004). El ORF390 tiene tres sitios putativos de corte en el extremo C-Terminal; dos para caspasa-9 y uno para caspasa-3. Algunos estudios han mostrado que el ORF390 es un inhibidor de caspasa de *P. monodon* y que el sitio de corte de caspasa-3 es importante para su función (Leu et al., 2009). Por lo anterior, es probable que el ORF390 funcione mediante un mecanismo similar al de AcMNPV P35. Por eso es razonable suponer que los camarones usan la apoptosis como una respuesta de protección para prevenir la dispersión de WSSV y por lo tanto, también es probable que WSSV produzca una proteína anti-apoptosis como ORF390 para bloquear la apoptosis y facilitar la replicación viral.

### **Estrategias contra el virus de la mancha blanca**

Se han intentado numerosas estrategias para el control de las enfermedades virales en los cultivos de camarones peneidos. Se ha tratado de contrarrestar su efecto mediante la aplicación de estrategias de bioseguridad como el control de los stocks de reproductores

(Lighthner 2005), filtración del agua (Schuur, 2003), uso de postlarvas certificadas (specific pathogen-free SPF) (Lightner y Redman, 1998) así como eliminar vectores y/o portadores (Lotz, 1997). Sin embargo, contra el virus de la mancha blanca, estas medidas no han sido eficaces para detener el impacto de esta enfermedad.

Por tal motivo, se han probado algunas herramientas biotecnológicas como subunidades de vacunas recombinantes (Witteveldt et al., 2004), microorganismos probióticos y extractos de plantas con propiedades antivirales (Peraza-Gómez et al., 2009), productos antivirales sintéticos, macroalgas y microalgas (Rahman et al., 2006a; Huynh et al., 2011) y recientemente el mecanismo de RNA de interferencia (RNAi) desencadenado mediante pequeños RNAs de interferencia (siRNA) ó por RNAs de doble cadena largos (dsRNA) (Robalino et al., 2005; Kim et al., 2007).

### **RNA de interferencia (RNAi)**

En el año 2003, la revista Science determinó que el descubrimiento más relevante del año había sido el RNA de interferencia (RNAi) por su enorme contribución a la biología celular moderna.

El campo del RNAi ha crecido de forma exponencial. Hoy en día, a 14 años de su descubrimiento existen miles de artículos científicos en donde se ha utilizado esta tecnología.

El RNAi fue descubierto como una convergencia de tres líneas de investigación que no estaban relacionadas entre sí. Sin embargo, el trabajo más relacionado fue el de Andrew Fire y Craig Mello. Ellos hicieron el gran descubrimiento de que el RNA de doble cadena (dsRNA) puede inducir un potente silenciamiento de genes en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998). Sin embargo, antes de este descubrimiento, otros estudios con plantas y hongos convergían en el silenciamiento de genes ocasionados por la expresión de un transgen o por replicación viral (Baulcombe, 2004).

Los pequeños RNAs de interferencia (siRNA) fueron detectados por primera vez en plantas y su relación con el RNAi en animales proporcionó la conexión del mecanismo de silenciamiento entre los dos reinos.

Primero se descubrieron pequeños RNAs que no se traducen y de manera natural regulan la expresión de RNAs mensajeros (mRNA) en *C. elegans* (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Estos fueron los primeros micro RNAs (miRNAs) descubiertos. Hoy en día, se sabe que los miRNAs inician el mecanismo de RNAi de manera natural y juegan un papel importante en la regulación génica en muchos organismos, desde nematodos hasta plantas y humanos (Bartel, 2004). Un modelo simplificado del mecanismo de RNAi está constituido por dos pasos. Cada paso involucra la acción de ribonucleasas. En el primer paso el mecanismo se dispara por dsRNA o miRNA, que son procesados y transformados a siRNAs mediante enzimas tipo RNAsaIII (Dicer y Drosha respectivamente). En el segundo paso, los siRNAs son cargados por un complejo efector (RISC) [RNA-induced silencing complex]. Dentro de este paso, el siRNA se desprende de una hebra durante el ensamblaje al RISC. Este siRNA de cadena sencilla ensamblado al RISC localiza el mRNA objetivo y se aparea por complementariedad. El silenciamiento del gen se da como resultado de la degradación nucleolítica del mRNA objetivo por la RNAsaH Argonata. Si el siRNA-mRNA tiene desajustes en el sitio de corte, el mRNA no es cortado. Por lo tanto, el silenciamiento es debido a una inhibición de la traducción (Hammond, 2005).

### **El RNAi en camarones**

En los camarones como en un gran número de invertebrados el RNAi es un mecanismo celular innato que se inicia cuando un dsRNA largo, es cortado por una RNAsa III (Dicer) en pequeños RNAs de silenciamiento (entre 21 a 26 pb). Estos RNAs pequeños se incorporan a complejos efectores de silenciamiento, que son guiados a secuencias complementarias blanco en el RNA mensajero (mRNA) con lo que se desencadena una degradación específica de estos (Fire 1998). Este mecanismo ha sido descrito en diferentes especies de camarón (Tirasophon et al., 2007; Xu et al., 2007). El RNAi ha sido evaluado como una medida preventiva y terapéutica contra infecciones virales en camarón (Shekhar y Lu, 2009).

La tecnología de RNAi ha provisto una herramienta muy efectiva para analizar la función de genes en camarón. Por ejemplo, el silenciamiento de células linfoides que expresan un receptor para el virus de la cabeza amarilla (YHV) en *P. monodon* (PmYRP65) permitió su

identificación e inhibió la entrada del virus (Assavalapsakul et al., 2006). En el mismo sentido, el silenciamiento de  $\beta$ -integrina, otro receptor en la superficie de la células inhibió la infección del virus de la mancha blanca, lo que sugiere que  $\beta$ -integrina actúa como receptor celular para WSSV (Li et al., 2007). El RNAi también ha sido utilizado para elucidar la función de genes involucrados en el crecimiento, muda y reproducción en camarones. La inyección con dsRNA de la hormona inhibidora de la gónada en *P. monodon*, incrementó los niveles de vitelogenina (Treerattrakool et al., 2008). En contraste, el silenciamiento de la hormona inhibidora de la muda en *Metapenaeus ensis* resultó en una disminución en la expresión de vitelogenina (Tiu et al., 2008). El silenciamiento de un efector de apoptosis (caspasa) en *M. japonicus* resultó en un incremento en el número de copias de WSSV, lo que apunta a que la inhibición de la apoptosis exacerba la infección por WSSV (Wang et al., 2008). En contraste, el bloqueo de caspasa-3 en *L. vannamei* provocó una protección significativa contra dosis bajas de WSSV (Rijiravanich et al., 2008). Esto sugiere que puede haber otros factores distintos a la apoptosis que contribuyen a la patogenicidad del virus. Al parecer, a niveles bajos de infección la apoptosis puede remover las células infectadas sin causar daño al camarón, pero cuando la infección se lleva a cabo con muchas partículas virales el exceso de células apoptóticas ocasionan fallas que afectan los tejidos del camarón y la infección se exacerba. Por lo tanto, la apoptosis como mecanismo de defensa puede ser un arma de doble filo.

El silenciamiento de una proteína relacionada con las Rab GTPasas, implicada en la formación y maduración de fagosomas, resultó en un incremento de copias de WSSV y un decremento en la actividad fagocítica contra *Vibrio parahaemolyticus* (Wu et al., 2008; Zong et al., 2008). Estos descubrimientos confirmaron el papel de la fagocitosis como defensa contra patógenos. En contraste, el silenciamiento de Rab7 inhibió la infección de WSSV y YHV en *P. monodon* (Ongvarrasopone et al., 2008), Leam-singh virus (LSNV) (Ongvarrasopone et al., 2010) y Taura síndrome virus (TSV) (Ongvarrasopone et al., 2011). El silenciamiento de la proteína QM, que es un supresor de tumores en camarón, reguló la activación de la proPO (Xu et al., 2008).

Los genes que son componentes del mecanismo de RNAi también fueron estudiados mediante dsRNA. El silenciamiento de Dicer-1, que es responsable de cortar los dsRNAs,

incrementó los niveles virales en camarón, lo que produjo un agudo incremento de la mortalidad (Su et al., 2008). El silenciamiento de Argonauta, otro gen involucrado con el RNAi, produjo alteraciones en el mecanismo de RNAi (Dechklar et al., 2008).

### **El RNAi contra genes virales en camarón**

A la fecha, varios estudios han demostrado que el RNAi dirigido a genes virales en camarón ha inhibido su correspondiente replicación. Estas inhibiciones se han llevado a cabo mediante siRNA en algunos casos y con dsRNA en otros (Kim et al., 2007; Thirasophon et al., 2005 y 2007; Westenberg et al., 2005; Wu et al., 2007; Xu et al., 2007; Yodmuang et al., 2006). También se ha logrado la producción de dsRNA específico del gen WSSV-vp28 sintetizado en bacterias. Este dsRNA inhibió exitosamente la replicación de WSSV (Sarathi et al., 2008 a y b). Estos estudios sugieren que el silenciamiento específico de genes virales puede ser una estrategia muy sólida contra infecciones virales en camarón. Además, algunos estudios han demostrado que cuando el RNAi no es específico para camarón, es decir que el dsRNA o siRNA no tiene ninguna relación ni con el virus ni con el camarón, de todos modos desencadena una respuesta parcial antiviral. Esto sugiere que el dsRNA puede inducir una respuesta inmune antiviral. Sin embargo, esta es muy leve y de poca duración (Robalino et al., 2004). Este fenómeno se observó en un experimento donde los camarones fueron inyectados con dsRNA o siRNA específicos del gen de la proteína florecente (GFP), que no es parte de los genes de camarón (Westenberg et al., 2005; Yodmuang et al., 2006). Estos resultados indicaron que la defensa antiviral innata en camarón puede ser provocada por una secuencia de dsRNA o siRNA independiente. Sin embargo, este efecto sólo se ha dado cuando el dsRNA se aplica antes de la inoculación del virus. En 2004 se determinó que el dsRNA de genes sin relación alguna con el camarón, produce una respuesta contra virus en camarón, específicamente TSV y WSSV. En ese momento le llamaron “Inmunidad antiviral” (Robalino et al., 2004). Posteriormente se demostró que el dsRNA específico de genes de WSSV es una herramienta muy efectiva para contrarrestar su replicación en camarones, además se observó que los mismos fragmentos de dsRNA digeridos *in vitro* por Dicer y aplicados a los camarones bajo las mismas condiciones de infección tienen un efecto mucho menos efectivo (Robalino et al.,

2005). Ese mismo año, otro grupo de trabajo demostró que el dsRNA específico de genes de YHV inhibió exitosamente la replicación viral en células de camarón. También se dieron cuenta por primera vez que el silenciamiento de diferentes genes virales tiene diferentes intensidades de respuesta (Tirasophon et al., 2005). Posteriormente, estos resultados obtenidos en cultivos celulares, fueron probados en camarones (*P. monodon*). La inyección de dsRNA correspondiente a una proteasa de YHV en el torrente hemolinfático, resultó en la completa inhibición de la replicación del virus (Yodmuang et al., 2006). En 2007 descubrieron que el dsRNA puede tener un efecto curativo contra virus en camarón. En (*P. monodon*) determinaron que se inhibe la replicación viral cuando el dsRNA de YHV-proteasa es aplicado tres horas después de la infección. Desafortunadamente el tratamiento no logró detener la infección en camarones infectados previamente 24 horas antes (Tirasophon et al., 2007). Aparentemente estos trabajos con YHV marcaron la pauta para investigar el efecto del RNAi contra WSSV. De aquí, se realizaron pruebas con siRNAs específicos de genes virales de WSSV como *dnapol*, *rr2*, *tk*, *tmk*, *vp24* y *vp28* que mostraron un efecto antiviral contra WSSV en (*L. vannamei*). Sin embargo, este efecto fue muy pobre con supervivencias entre 20% a 40% (Wu et al., 2007). Otro estudio que se realizó con siRNA de *vp28* demostró que el efecto es dependiente de la cantidad de virus que infecta al camarón. En un experimento con camarones tratados con siRNA-*vp28* y retados contra diferentes dosis de WSSV se observó que el efecto antiviral es inversamente proporcional a la cantidad de virus con que se retó (Xu et al., 2007). En el mismo sentido, se realizaron pruebas con dsRNA para contrarrestar la replicación del WSSV en *Penaeus chinensis*. El experimento consistió en bloquear la expresión de dos genes de WSSV: *vp28* y *vp281*. Los resultados indicaron que el efecto antiviral depende del gen al que va dirigido el bloqueo así como de la concentración viral contra la que se reta el organismo (Kim et al., 2007). El RNAi ha demostrado ser una herramienta sumamente poderosa contra virus en camarón. Sin embargo, el alto costo que implica la síntesis de las moléculas de dsRNA es una desventaja evidente para escalar los resultados obtenidos en laboratorio a niveles industriales. En 2008 se logró producir dsRNA en bacterias. La estrategia consistió en insertar las secuencias de *vp28* sentido y antisentido unidas en un plásmido. Posteriormente, bacterias de *E. coli* (deficientes de RNAsaIII) fueron transformadas con

este plásmido, de esta manera la bacteria produjo un falso mRNA que por complementariedad se pliega sobre si mismo y forma un dsRNA. Esta estrategia funcionó muy bien, se obtuvieron supervivencias de 100% en camarones tratados con dsRNA producido en bacterias y retados contra WSSV (Sarathi et al., 2008a). Posteriormente, este mismo autor aplicó estas bacterias inactivadas a partículas de alimento que después fue suministrado a los animales experimentales y finalmente retados contra WSSV. Los resultados mostraron una supervivencia de 68% en los organismos alimentados con las bacterias productoras de dsRNA contra 0% en los camarones no tratados (Sarathi et al., 2008b). Finalmente, se probó la misma metodología con bacterias que producen dsRNA de varios genes de WSSV por separado (vp15, vp19, vp24, vp26). Los resultados indicaron diferentes respuestas antivirales contra WSSV, reafirmando la teoría de que el efecto antiviral depende del gen al que va dirigido el bloqueo, por lo tanto concuerdan con los resultados donde el dsRNA es producido in-vitro (Sarathi et al., 2010). Una vez que el mecanismo de RNAi se hizo popular en camarones como herramienta antiviral, se realizaron investigaciones para conocer los genes relacionados con los mecanismos de infección.

### **Silenciamiento de genes endógenos para contrarrestar virus en camarón**

Se han alcanzado avances importantes en la caracterización de WSSV. Sin embargo, su mecanismo de infección es poco conocido. Gracias a la facultad del RNAi de silenciar genes de manera específica se ha logrado identificar algunas proteínas relacionadas con el mecanismo de infección de WSSV en camarones. 2007 Li et al., (2007) publicaron el hallazgo de que  $\beta$ -integrina de *M. japonicus* sirve como receptor para el WSSV mediante la unión de un motivo RGD (Gli, Arg, Asp) en la proteína VP187 del virus con la subunidad  $\beta$  de integrina. El silenciamiento mediante dsRNA del gen que codifica para  $\beta$ -integrina inhibió la infección viral. Este fue el primer reporte de una proteína relacionada con el mecanismo de infección de WSSV.

Se han observado signos de apoptosis en los órganos de camarones infectado con WSSV. Si la apoptosis es benéfica o perjudicial todavía está en controversia. En este sentido, el silenciamiento del gen endógeno caspasa-3 que es un inductor de la apoptosis en *L.*

*vannamei* incrementó la supervivencia de los camarones retados contra dosis bajas de WSSV, pero contra dosis altas no observaron ningún efecto (Rijiravanich et al., 2008). Los autores concluyeron que la apoptosis puede exacerbar la mortalidad en vez de reducirla. En contraste, Otros estudio con Hsp70 cuya sobreexpresión inhibe la apoptosis, mostraron que en camarones infectados con WSSV los niveles de Hsp70 se incrementan y evitan la apoptosis (Yan et al., 2010).

Otra proteína identificada como receptor de WSSV es la Tetraspanina-3 que tiene un dominio extracelular considerado como posible objetivo de algunos virus. Tetraspanina se ha detectado en muchos invertebrados, sin embargo, no se sabe mucho de su funcionamiento. El silenciamiento de este gen en *Fenneropenaeus chinensis* redujo el número de copias virales en camarones retados contra WSSV (Gui et al., 2012). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que Tetraspanina-3 es un receptor celular para WSSV en camarones.

En 2006 se describió una pequeña GTPasa en *P. monodon* (PmRab7) la cual fue descrita como una proteína que se une a VP28 de WSSV y que está relacionada con el proceso de la infección (Sritunyalucksana et al., 2006). Más adelante, se descubrió que el silenciamiento de Rab7 en *P. monodon* produce un efecto contra WSSV. La propiedad antiviral de Rab7 ha sido evaluada en postlarvas y juveniles de camarón (Ongvarrasopone et al., 2008; Attasart et al., 2009). También se ha investigado su efecto antiviral contra otros virus de camarón. Por ejemplo, camarones tratados con PmRab7-dsRNA inhibieron la infección contra YHV (Ongvarrasopone et al., 2008), Leam-singh virus (LSNV) (Ongvarrasopone et al., 2010) y TSV (Ongvarrasopone et al., 2011).

Aparentemente Rab7 es muy importante en el mecanismo de infección de muchos virus que infectan camarones, sin embargo, todavía es muy poco lo que se sabe sobre las funciones que desempeña, por eso, es necesario realizar más investigaciones para conocer el potencial del silenciamiento de este gen contra infecciones virales en camarones.

## **Rab 7**

Las proteínas Rab (Ras-associated binding) son pequeñas GTPasas que regulan la fusión y el transporte intracelular de membranas y vesículas en las células eucariotas (Rodman y



Wandinger-Ness, 2000). En cada vesícula existe una proteína llamada v-SNARE (debido a su origen vesicular) (N-ethylmaleimide sensitive factor accessory protein, SNAP, receptors), mientras que en las membranas objetivo se designan t-SNARE (target). Ciertas moléculas de v-SNARE se unen con determinados t-SNARE mediante la interacción de las hélices de cada proteína que se envuelven entre sí y forman complejos llamados trans-SNARE, los cuales inmovilizan, acercan y median la unión de las membranas involucradas. De esta manera las membranas de los endosomas, del organelo blanco o de otras vesículas se fusionan (Zhao et al., 2007).

Las SNARE son las responsables del anclaje y la fusión de las vesículas con su membrana objetivo, mientras que las Rab regulan las diferentes etapas de maduración y transporte vesicular, con lo cual participan tanto en la endocitosis como en la exocitosis. Las Rab regulan diferentes pasos en las vías de transporte vesicular intracelular, como la formación de vesículas, movilidad de vesículas, el remodelado de la membrana vesicular, el acoplamiento de las vesículas a su membrana objetivo y la fusión de membranas mediante la regulación de proteínas como las SNARE (Stenmark y Olkkonen, 2001). Las diferentes Rab se localizan en la cara del citosol de membranas intracelulares (de vesículas u organelos). Sin embargo, para que una proteína Rab se inserte en una membrana, debe sufrir modificaciones en su porción carboxi-terminal, en uno o dos motivos de cisteína, mediante la unión covalente de grupos hidrofóbicos isoprenil conocidos como geranylgeranyl. En general, el tránsito y la localización de cada proteína Rab depende de las modificaciones lipídicas que proveen un punto de anclaje a la membrana y de la región carboxi-terminal de las Rab (Seabra y Wasmeier, 2004). Las proteínas Rab circulan de una forma inactiva GDP a una activa GTP para entrar en funcionamiento. Las Rab recicladas son transportadas en su forma inactiva (GDP) por un GDI (Guanosine Nucleotide Dissociation Inhibitor), que es un inhibidor de la disociación del GDP a su membrana respectiva. Una vez que llegan a la membrana GDI se desprende y deja anclada a Rab todavía inactiva (Seabra y Wasmeier, 2004). La activación de las Rab ocurre por intercambio del nucleótido catalizado por GEF (Guanine Nucleotide Exchange Factor) que transforma el GDP de Rab a GTP (su forma activa) para poderse mover a la membrana objetivo. Finalmente, después de realizar su función, el GTP es hidrolizado a GDP todavía

en la membrana objetivo. De ahí, el GDI nuevamente se une y la extrae para reiniciar el ciclo (Stenmark y Olkkonen, 2001). Rab7 se encuentra principalmente en endosomas tardíos y está ausente en los tempranos (Chavrier et al., 1990). Mediante microscopía confocal, se determinó que las GTPasas de endosomas tempranos como Rab4 y Rab5, no se localizan simultáneamente con Rab7 (Vitelli et al., 1997). Estas evidencias reafirmaron la teoría de que Rab5 y Rab7 forman parte de compartimentos diferentes. Mediante análisis bioquímicos en células transfectadas con Rab7 se determinó que ésta se encuentra principalmente en estructuras endocíticas terminales como endosomas tardíos y lisosomas (Meresse et al., 1995; Vitelli et al., 1997). Posteriormente se comprobó que Rab7 regula el transporte y la fusión de endosomas tardíos con lisosomas (Bucci et al., 2000).

### **Endocitosis como mecanismo de entrada de virus a la célula**

La endocitosis es el proceso mediante el cual ingresan a la célula solutos, moléculas y partículas de distintos tipos. Este proceso consiste en la invaginación de la membrana plasmática, lo que permite la formación de una vesícula cuyo contenido es transportado del exterior al interior de la célula. La endocitosis tiene un papel fundamental en diferentes procesos celulares como la respuesta inmune, la comunicación intercelular, la transducción de señales y la homeostasis tanto celular como del organismo completo. Este proceso celular está constituido por una red de varios organelos los cuales difieren en su composición proteica y propiedades bioquímicas. Las proteínas Rab contribuyen a la diferenciación entre los distintos tipos de endosomas. De manera general, una molécula que quiere entrar a la célula (la carga) se une a un receptor en la membrana: esta unión favorece la formación de una vesícula endocítica. Esta vesícula se fusiona mediante Rab4 y Rab5 con el endosoma temprano que puede recibir a más de una vesícula endocítica. De esta manera, la carga entra al endosoma temprano que tiene un pH ligeramente más ácido que el citoplasma. Este pH permite desacoplar la carga del receptor que queda unido a la membrana del endosoma. De ahí, un endosoma de reciclamiento formado por Rab11 quita al receptor del endosoma temprano para llevarlo nuevamente a la membrana celular para iniciar el ingreso de otra carga a la célula. Las moléculas que son destinadas a su degradación o que requieren llegar a otros compartimentos dentro de la célula pasan del

endosoma temprano al tardío mediante una fusión de membranas. El endosoma tardío está constituido por Rab7 y el pH interno es menor a 6. Finalmente el endosoma tardío se fusiona con el lisosoma primario. Esta fusión permite que la carga se ponga en contacto con hidrolasas que procesan la carga. En el transcurso de este mecanismo, existen posibles rutas de escape para evitar la degradación por los lisosomas. Las rutas de endocitosis se han clasificado de acuerdo a las proteínas que forman las vesículas endocíticas (clatrina, caveolina, flotilina, macropinositosis y otras independientes).

Los virus son parásitos intracelulares obligados, formados por una cubierta proteica (cápside) que rodea el material genético. Algunos virus tienen además, una envoltura lipídica proveniente de la célula que infectó previamente. El ciclo replicativo de cualquier virus comienza con la unión de éste a sus receptores, lo que provoca cambios en la partícula viral que favorece las siguientes etapas. El siguiente paso es la penetración de la membrana celular. Este paso puede llevarse a cabo en la membrana plasmática o en membranas intracelulares de diferentes organelos de acuerdo a los requerimientos de cada virus (generalmente el núcleo). Muchos virus utilizan las vías de endocitosis para entrar a la célula. Una vez internalizada, la partícula viral libera su genoma para que pueda ser replicado y/o traducido. Finalmente las nuevas proteínas virales se ensamblan para generar partículas virales que salen de la célula para infectar otras adyacentes. Cuando un virus entra a la célula mediante el proceso de endocitosis, evita la barrera del citoesqueleto de actina cortical que se encuentra inmediatamente debajo de la membrana plasmática y forma una malla difícil de atravesar. Además, los organelos endosomales los transportan y el pH ligeramente ácido así como las proteasas que contienen son muy utilizados por los virus para facilitar procesos como el desnudamiento de la partícula.

La endocitosis mediada por clatrina es uno de los mecanismos más utilizados entre los virus. Esta vía es utilizada por virus de diferentes familias (Chu y Ng, 2004; Sun et al., 2005). Las proteínas Rab 5 y Rab7 están estrechamente ligadas con este mecanismo, por lo que su silenciamiento mediante RNAi interfiere con el mecanismo de endocitosis, lo que impide la llegada del virus al organelo objetivo para su replicación. Por ejemplo, el silenciamiento de Rab5 y Rab7 disminuyó significativamente la replicación del virus de la hepatitis C (HCV por sus siglas en inglés) en células cultivadas (Manna et al., 2010).

En camarones se descubrió que el silenciamiento de Rab7 tiene un efecto significativo en la supervivencia de camarones retados contra WSSV (Attasart et al., 2009; Ongvarrasopone et al., 2010; Alvarez-Ruiz et al., 2012). Además se descubrió que Rab7 en camarones tiene afinidad con la proteína viral VP28 de WSSV (Sritunyalucksana et al., 2006). De aquí que al poner en contacto a proteínas Rab7 recombinantes con el WSSV, estas se unieron a las VP28 del virión y bloquea los sitios receptores que se unirían a las verdaderas Rab7 en el proceso de infección. De esta manera el virus perdió significativamente su infectividad (Sritunyalucksana et al., 2006). Se han producido proteínas recombinantes de Rab7 en bacterias, sin embargo se han quedado a nivel experimental porque no es recomendable utilizarlas en un producto de consumo humano. Por tal motivo, recientemente se produjeron Rab7 recombinantes en *Pichia pastoris*, con la finalidad de ser aplicadas al alimento (Jupatanakul et al., 2011). En resumen, el mecanismo de endocitosis parece ser la principal vía de movimiento utilizada por el virus de la mancha blanca para infectar a las células de camarón. Por esto, se han implementado diversas estrategias encaminadas a manipular este mecanismo como medida terapéutica contra WSSV.

## **Justificación**

El virus de la mancha blanca (WSSV) es el patógeno viral más devastador que afecta a los cultivos de camarón en todo el mundo, incluido México. La enfermedad de la mancha blanca ocasiona mortalidades importantes en cada brote. Desde su primera aparición en México a finales de los 90s, los brotes de WSSV han sido recurrentes cada año.

En un principio se trató de contrarrestar su efecto mediante la aplicación de estrategias de bioseguridad. Se puso especial atención al control de reproductores, a la filtración del agua, se utilizaron postlarvas certificadas (specific pathogen-free SPF) así como la eliminación de vectores y/o portadores del virus. Sin embargo, estas medidas no fueron eficaces para detener su impacto. Posteriormente se evaluaron de manera experimental una gran cantidad de estrategias biotecnológicas como subunidades de vacunas recombinantes, microorganismos probióticos, extractos de plantas con propiedades antivirales, productos antivirales sintéticos, macroalgas y microalgas entre otras (Witteveldt et al., 2004; Rahman et al., 2006; Peraza-Gómez et al., 2009; Huynh et al., 2011). Aunque algunas de estas estrategias han mostrado cierto efecto contra el virus, ninguna ha sido lo suficientemente potente o perdurable para detener la mortalidad en el campo. Recientemente se ha demostrado que el mecanismo de RNA de interferencia (RNAi) desencadenado mediante pequeños RNAs de interferencia (siRNA) ó RNAs de doble cadena (dsRNA), es una herramienta antiviral sumamente efectiva en invertebrados. En camarón, el RNAi ha sido evaluado principalmente como una medida preventiva contra virus y existe un trabajo en donde se comprobó que puede ser curativo (Robalino et al., 2005; Kim et al., 2007; Tirasophon et al., 2007; Posiri et al., 2011).

Aunque el efecto antiviral del RNAi es muy prometedor, tiene una limitante. La forma de hacer llegar el mecanismo a grandes poblaciones de camarones cultivados. En México, como una medida preventiva de dispersión del WSSV, se ha restringido el número de camarones por metro cuadrado que se pueden cultivar en zonas epidémicas ( $\sim 10/m^2$ ). Sin embargo, aunque esta es una densidad moderada, representan cien mil por hectárea y generalmente los estanques son más grandes. De aquí, la necesidad de encontrar estrategias para hacer llegar el RNAi a poblaciones grandes de camarones a un costo razonable, así como encontrar estrategias que protejan contra el WSSV aún en ausencia del virus.

En este sentido, para combatir al virus de la mancha blanca, las estrategias que se han desarrollado con el RNAi son dos: (1) el silenciamiento de genes virales y (2) el silenciamiento de genes endógenos involucrados con el desarrollo del virus.

La eficacia del RNAi para inhibir la replicación de WSSV en camarones, depende del tamaño del dsRNA, de la dosis, de la cantidad de virus aplicada así como de la proteína silenciada. El silenciamiento de genes virales contra WSSV ha dado muy buenos resultados. En algunos casos se obtuvo el 100% de supervivencia en camarones retados bajo condiciones experimentales. Sin embargo, el efecto de este tratamiento se pierde gradualmente si el camarón no se infecta (Mejía-Ruiz et al., 2011). Por ejemplo. En *L. vannamei*, el silenciamiento de genes de WSSV desencadenó una potente respuesta antiviral en animales infectados 48 horas después de la aplicación del dsRNA. Pero, su eficiencia se perdió gradualmente en ausencia del virus. En contraste, el efecto del RNAi fue más duradero cuando los animales fueron sometidos a re-infecciones (Mejía-Ruiz et al., 2011). Es decir, el efecto antiviral del RNAi dirigido a genes virales se pierde porque cuando el camarón no está infectado no hay mRNAs que preserven el efecto. Estos resultados sugirieron que el RNAi necesita estar en presencia de mRNAs objetivo para reactivarse. Una posible explicación a este fenómeno es lo que se observó en el nematodo *C. elegans*. En este organismo se descubrió que el mecanismo de RNAi potencia su efecto al formar siRNAs secundarios sintetizados por una RNA polimerasa dirigida a RNA (RdRPs). Esta RNA polimerasa usa mRNAs objetivo como sustrato para producir nuevos siRNAs. Este trabajo se realizó bajo el supuesto de que en camarones sucede un fenómeno similar, entonces en ausencia de mRNAs objetivo, el mecanismo de RNAi en camarones pierde su efecto. Ya que la interferencia de la síntesis de proteínas virales puede perderse en ausencia del genoma viral y que las proteínas virales se unen a proteínas endógenas, entonces en este trabajo se planteó la posibilidad de interferir la síntesis de proteínas endógenas como una forma de prolongar el efecto de interferencia. Sin embargo, dado que la interferencia de una proteína endógena puede afectar otras funciones este trabajo se orientó a conocer la efectividad de la interferencia en la síntesis de Rab7 frente a la presencia de WSSV, la duración del efecto protector y las consecuencias secundarias de esta interferencia.

Por lo tanto, en este estudio, el objetivo fue silenciar el gen endógeno Rab7 del camarón *L. vanamei* que está relacionado con el mecanismo de infección del WSSV por endocitosis mediada por receptores. De esta manera, teóricamente los mRNAs estarán presentes desde la aplicación del dsRNA y por lo tanto habrá siRNAs secundarios que promoverán el efecto de silenciamiento. De esta manera, indirectamente, la respuesta antiviral protegerá a los camarones durante periodos prolongados.

En 2006 se describió una pequeña GTPasa en *P. monodon* (PmRab7) la cual fue descrita como una proteína que se une a VP28 de WSSV y que está relacionada con el proceso de la infección. Más adelante, se descubrió que el silenciamiento de PmRab7 produce un efecto contra WSSV. La propiedad antiviral producida por el silenciamiento de Rab7 ha sido evaluada en postlarvas y juveniles de *P. monodon* con resultados muy promisorios. Sin embargo, a la fecha, no hay información disponible del efecto de Rab7 contra WSSV en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) ni en reproductores. Entonces, es necesario determinar el efecto antiviral del silenciamiento de Rab7 en reproductores de camarón blanco. De aquí que, resulta necesario identificar la posible presencia de un gen homólogo a Rab7 en *L. vannamei* y comparar la eficacia de la dosis en la interferencia de su expresión y su relación con la infección de WSSV.

Hasta el momento, la manera más eficiente de aplicar el dsRNA a los camarones es mediante inyección. Por ello, resulta inviable su aplicación a las postlarvas por su gran número y su tamaño pequeño, sin embargo, podría aplicarse a los reproductores en los laboratorios de producción de postlarvas para disminuir el riesgo de transmisión vertical de virus.

Dado que los reproductores son la fuente de postlarvas usadas en las granjas acuícolas y su vida reproductiva útil es de aproximadamente de 60 días, será de gran utilidad conocer la durabilidad del tratamiento con dsRNA como una medida preventiva contra WSSV y disminuir el riesgo de transmisión a la progenie.

Para ello, es necesario determinar la duración del efecto de silenciamiento de LvRab7 mediante una sola aplicación de dsRNA en reproductores de camarón y adicionalmente es necesario conocer el efecto del silenciamiento sobre la infección de WSSV en la progenie

de hembras tratadas con dsRNA-Rab7 para determinar si el efecto antiviral se transmite a la siguiente generación.

Aunque el mecanismo de RNAi ha demostrado ser una herramienta poderosa para impedir la replicación de WSSV, es poco lo que se conoce sobre la duración del efecto antiviral producido por el silenciamiento de genes de camarón y sus consecuencias sobre su supervivencia. Este es el primer estudio donde se plantea que el bloqueo de LvRab7 puede producir un efecto potente y duradero contra el WSSV.



## Objetivo general

Evaluar la respuesta contra el virus de la mancha blanca (WSSV) desencadenada mediante el silenciamiento del gen endógeno Rab7 en reproductores de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) y determinar la transferencia del efecto antiviral a la progenie F1.

## Objetivos particulares

1. Detectar mediante RT-PCR un gen homólogo a Rab7 en *L. vannamei* y definir su secuencia.
2. Verificar el silenciamiento mediante la cuantificación de la expresión de LvRab7 en hemocitos, pleópodos y branquias de *Litopenaeus vannamei* tratados con RNA de doble cadena específico de LvRab7.
3. Inducir el silenciamiento de LvRab7 en camarones reproductores de *L. vannamei* inyectando fragmentos de dsRNA de diferente tamaño y evaluar su efecto antiviral contra WSSV
4. Inducir el silenciamiento de LvRab7 por el mecanismo de RNA de interferencia (RNAi) en camarones reproductores, mediante la inyección de una dosis baja o una dosis alta de dsRNA específico y evaluar la respuesta antiviral contra una dosis viral alta o baja del virus de la mancha blanca (WSSV).
5. Evaluar la duración del efecto contra WSSV inducido mediante el silenciamiento de LvRab7 en reproductores de *L. vannamei*.
6. Determinar mediante ensayos de reto, si la protección antiviral se transfiere a la descendencia de *L. vannamei*, después de haber silenciado LvRab7 en las hembras reproductoras.
7. Identificar si el silenciamiento de LvRab7 en camarones reproductores ocasiona cambios fenotípicos y/o de comportamiento en camarones reproductores y/o en la progenie.

## **Hipótesis**

En juveniles de *Penaeus monodon* se ha demostrado que el silenciamiento del gen Rab7 (PmRab7) produce una respuesta contra el virus de la mancha blanca (WSSV); si se demuestra que en reproductores de *Litopenaeus vannamei* existe un homólogo de Rab7, entonces su silenciamiento producirá una respuesta contra WSSV tanto en ellos como en su progenie.

## Materiales y métodos

### Diseño de Oligonucleótidos

Los Oligonucleótidos de Rab7 y WSSV utilizados en este estudio fueron diseñados mediante el programa “Primer-3 versión 4.0” de acceso libre en Internet (<http://primer3.wi.mit.edu/>).

Para detectar Rab7 en *L. vannamei* (LvRab7), se diseñaron dos Oligonucleótidos Forward y dos Reverse sobre una secuencia de *P. monodon*-Rab7 (PmRab7) (GenBank accesión DQ231062) (Figura 5).

				<b>LvRab7 F1 5' -----&gt;3'</b>	
Forward	1	GCACGAGGCGCCGTGCTGCAGCTCGGATTTCTCCTGTTATTTCCCTCCCAAAGTACATC	ATGGCATCTCGCAAGAAGATTCTCCTGAAGGTGATCATCC	100	
Reverse	1	CGTGCTCCGCGCACGACGCTCGAGCCTAAAGAGGACAAATAAAGGGAGGGTTTCATGTAG	TACCGTAGAGCGTCTCTTAAGAGGACTCCACTAGTAGG	100	
				<b>LvRab7-F2 5' -----&gt;3'</b>	
Forward	101	TGGGAGACTCTGGTGTAGGCAAACATCCCTTATGAACCAAGTTTGTAAACAAGAAATTCAGCAACCAGTACAAGGCAACCATTGGGGCAGACTTCCTCAC		200	
Reverse	101	ACCCTCTGAGACCACATCCGTTTGTAGGGAATACTTGGTCAAACAATTTGTCTTAAAGTCGTTGGTCATGTTCCGTTGGTAACCCCGTCTGAAGGAGTG		200	
				<b>---&gt;3'</b>	
Forward	201	AAACGAGGTTATGGTTGATGACAGATTGGTCACAATGCAGATCTGGGATACAGCTGGTCAAGAGAGATTCCAGTCGTTAGGTGTGCATTCTATCGAGGA		300	
Reverse	201	TTTCTCCAATAACCACTACTGTCTAACCAAGTTTACGTCTAGACCTATGTCGACCAGTCTCTCTAAGGTCAGCAATCCACAACGTAAGATAGCTCCT		300	
Forward	301	GCTGATGTTGTGTTCTTGCTATGATGTTACATCTCCCAACACCTTCAAGTCTCTTGATTCGTGGCGTGACGAGTTCTAATTCAGCCTCACC AAGGG		400	
Reverse	301	CGACTAACACACAAGAACAGATACTACAATGTAGAGGGTTGTGGAAGTTCAGAGAACAAGCACCACACTGCTCAAAGATTAAGTTCGGAGTGGTTCCC		400	
Forward	401	ACCCTGATCACTTCCCATTGTTGTCCTGGGTAACAAGATTGATCTGGAGAATAGGGCGGTATCAACGAAGCGAGCACAACAATGGTGCATAGTAAAAA		500	
Reverse	401	TGGGACTAGTGAAGGTTAAACAACAGGACCCATTGTTCTAACTAGACCTTTATCCCGCATAGTTGCTTCGTTCTGTTTACCACAGATCATTTTTT		500	
				<b>3'  -----5' LvRab7-R2</b>	
Forward	501	TGAAGTTCCTACTTTGAAACTAGTGCAAAGGAAGCCATTAATGTGGAGTTAGCCTTCCAGACCATTGCTCGCAATGCTCTTGCTCAGGAGTCTGAAGTG		600	
Reverse	501	ACTTCAAGGGATGAAACTTTGATCACGTTTCCTTCGGTAATACACCTCAATCGGAAGTCTGGTAACGAGCGTTACGAGAACGAGTCTCCAGACTTCC		600	
Forward	601	GAACTCTACAATGAGTTTCCAGACCAGATCAAATGACCAATGACAACAAGGCTAAACAGGATGCATGCTCTTGCTAATAATCACTCTGTAATGATTTTTC		700	
Reverse	601	CTTGAGATGTTACTCAAAGGTCGCTAGTTTAACTGGTTACTGTTGTTCCGATTTGCTTACGTACGAGAACGATTATTAGTGAGACATTACTAAAAAG		700	
				<b>3'  -----5' LvRab7 R1</b>	
Forward	701	TAGTACGTTAGAAGGAAGCACTTGGTTCATTTGTGATATCAGATACATGCGCTCAGAAGAGAAGAGAGGGATCTGTAATCYCGGGCCGTTCCAGGAGC		800	
Reverse	701	ATCATGCAATCTTCTTCGTGAACCAAGGTAACACTATAGTCTATGTACGCGAGTCTTCTTCTCTCCCTAGACATTAGRCCCGCCCAAGGTCCTCG		800	
Forward	801	AACTTTGAGTGTGACTGACCATTGTTGCGGACGATCACTACTTGTACATACAGTGGTGCYCCAGACAATACTTTTTGGGAGTATACTTGCACCTTTA		900	
Reverse	801	TTGAAAACACACTGACTGGTACAACACGCTGTAGTGTAGTGAACATGTATGTCACCACGRGGTCTGTTATGAAAAAACCCATATAGAACGTGGAAAT		900	
Forward	901	TCAACATTTACATGGGGATTGGCCTTAACGTTTGTGTCCTTTTGTGTCCTTTTCTTCTTCTTTTCTTTACTTCTTTTCTCTTCTAGAAAATG		1000	
Reverse	901	AGTTGTAAGTGTACCCCTAACCGAATTGCAACAAAACACGGAAAAAAGAAAGAAAGAAATGAAGAAAAAGAGGAGAAGATCTTTAC		1000	
Forward	1001	TTACTTCTACTTCAACTCTAAGTTTTATTATTATTATTATTTTTTTATCATTATTTTATTATTATTTTTTTTCTTCTTTCTTTCTTCTTCTAGAAAATG		1100	
Reverse	1001	AATGAAGATGAAGTTAGAATTCAAAATAAATAATAATAATAAAAAAATAGTAATAAAAAATAAATAAAAAAAGAAACAAGGATAGAGTAGTCTCT		1100	
Forward	1101	TCCTTGGACAAAACCTTATAAAGGAACAGTGTATGAGGAGGAAATATCAAACTGAAATATGGGAAGGTTCTCTCTTGTATTCTTCTGCTTAATTGT		1200	
Reverse	1101	AGGAACCTGTTTTTGAATATTTCCCTGTGCACAATACTCCCTCTTTATAAGTTTTGACTTTATACCCCTTCCAGAGAGAATAAGAAAGACGAATTAACA		1200	
Forward	1201	TTGATATTTTATTGAATGAGCAATCTTTAGTTATGTGGAATCATGCAGGTTTAGACCCCTTGGTATTACTGAGAAGGTGGAATATTGTCCTTATCTA		1300	
Reverse	1201	AACTATAAAATAACTTACTCGTTAGAAATCAATACACCTTTAGTACGTCCAAATCGTGGGGGAACCATATGACTCTTCCACCTTATAACAGGAATAGAT		1300	
Forward	1301	ATAAATCTCTTGTATGATCAACAATTATAGAATTTAAGAAAAA		1357	
Reverse	1301	TATTTAAGAGAATACTACTAGTGTGAATATCTTAAATCTTTTTTTTTTTTTTTT		1357	

Figura 5. Oligonucleótidos diseñados en la secuencia de Rab7 en *P. monodon*. El marco de lectura abierta está coloreado en gris claro. La secuencia y el nombre de los Oligonucleótidos Forward están sombreados de negro y los Oligonucleótidos Reverse de gris oscuro.

Los Oligonucleótidos para medir la expresión de LvRab7 mediante PCR cuantitativo (qPCR) fueron diseñados en una secuencia obtenida en este estudio aislada de camarones reproductores (*L. vannamei*) (Figura 6).

```

Forward 1 ATGGCATCTCGCAAGAAGATTCTCCTGAAGGTGATCATCCTTGGAGACTCAGGTGTAGGCAAACATCCCTTATGAACAGTTTGTAAACAAGAAATTCA 100
Forward 1 TACCGTAGAGCGTTCTTCTAAGAGGACTTCCACTAGTAGGAACCTCTGAGTCCACATCCGTTTTGTAGGGAATACTTGGTCAAACAATTGTTCTTTAAGT 100
Forward 1 GCAACCAAGTATAAGCAACCAATTGGAGCAGATTCTCCTCACAAAGGAGGTCATGGTTGATGACAGATGGTTACCATGCAGATCTGGGATACAGCTGGTCA 200
Forward 1 CGTTGGTCATATCCGTTGGTAACTCGTCTAAAGGAGTGTTCCTCCAGTACCAACTACTGTCTAACCAATGGTACGCTAGACCCCTATGTCGACCAGT 200
Forward 1 AGAAAGATTTCATCGTTAGTGTTCATTCTATCGAGGAGCTGATGTTGTGTCTCGCTCTATGATGTTACATCTCCCAATACCTTCAAGTCTCTCGAT 300
Forward 1 TCTTTCTAAAGTTAGCAATCCACAACGTAAGATAGCTCCTCGACTAACCAACACAGAGCAGATACTACAATGTAGAGGGTTATGGAAGTTCAGAGAGCTA 300
Forward 1 TCATGGCGTGACGAGTTTCTAATTCGAAGCCTCACCAAGGGACCCTGACCACCTTCCCATTGTTGTCCTGGGTAACAAGATTGATCTGGAGAATAGGGCGG 400
Forward 1 AGTACCGCACTGCTCAAAGATTAAGTTCGGAGTGGTTCCTGGGACTGGTGAAGGGTAAACAACAGGACCCATTGTTCTAACTAGACCTTTATCCCGCC 400
Forward 1 TATCGACGAAGCGAGCACAACAATGGTGTATAGTAAAAATGAAGTTCCTACTTTGAAACTAGTGCAAAGGAAGCTATTAAATGTGGAGCTAGCTTTCCA 500
Forward 1 ATAGCTGCTTCGCTCGTGTGTTACCACAGTATCATTTTTACTTCAAGGGATGAAACTTTGATCACGTTTCCTTCGATAATTACACCTCGATCGAAAGGT 500
Forward 1 GACCATTGCTCGCAATGCTCTTGCTCAGGAGTCAGAGGTGGAGCTGTACAATGAGTTTCAGACCAGATCAAATTGACCAATGACAACAAGGCTAAACAG 600
Forward 1 CTGGTAACGACGCTTACGAGAACGAGTCTCAGTCTCCACCTCGACATGTTACTCAAAGGTCTGGTCTAGTTTAACTGGTTACTGTTGTTCCGATTGTC 600
Forward 1 GATGCATGCTCTTGCTAA 618
Forward 1 CTACGTACGAGAAGCATT 618

```

Figura 6. Posición de Oligonucleótidos utilizados para medir mediante qPCR la expresión del LvRab7. Los Oligonucleótidos fueron diseñados en la secuencia obtenida de camarones reproductores de *Litopenaeus vannamei* de Sinaloa.

Los Oligonucleótidos para detectar WSSV fueron diseñados en la secuencia del gen viral WSSV-VP28 (Gen Bank acceso AF332093).

Como control interno en las reacciones de RT-PCR se utilizaron un par de Oligonucleótidos reportados con anterioridad que amplifican un fragmento de  $\beta$ -actina de camarón (Yang et al., 2006).

Los Oligonucleótidos utilizados para medir la expresión de genes de referencia en el PCR cuantitativo (qLvan-40S-S24-F/R, qLvan-Ef-F/R, qLvan-UBIQ-F, qLvan-F8-F/R, qLvan18S-F/R) fueron amablemente provistos por la Dr. Ana María Ibarra Humphries y el M.C. Raúl Llera Herrera del CIBNOR La Paz.

La secuencia de todos los Oligonucleótidos utilizados en este estudio se muestra a continuación en la Tabla I.

Tabla I. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Primer	Secuencia	Fragmento amplificado (pb)	Análisis
LvRab7-F1 LvRab7-R1	5' ATGGCATCTCGCAAGAAG 3' 5' TTAGCAAGAGCATGCATCC 3'	618	Detección de LvRab7 Producción de dsRNA
LvRab7-F2 LvRab7-R1	5' GGGCAGACTTCCTCACAAAG 3' 5' TTAGCAAGAGCATGCATCC 3'	494	Producción de dsRNA
LvRab7-F1 LvRab7-R2	5' ATGGCATCTCGCAAGAAG 3' 5' CGCCCTATTCTCCAGATCAA 3'	399	Expresión de LvRab7 RT-PCR
WSSV-VP28-F1 WSSV-VP28-R1 VP28-F3 VP28-R3	5' CTCTTTCGGTCGTGTCGGCC 3' 5' GAGACGGGGGTGAAGGAGGAGG 3' 5' AA <u>CTGCAG</u> ATGGATCTTTCTTTC 3' 5' AA <u>CTGCAG</u> TACTCGGTCTCAG 3'	469 615	Detección de WSSV PCR y RT-PCR
$\beta$ -actinF $\beta$ -actinR	5' GAAGTAGCCGCCCTGGTTG 3' 5' CGGTTAGCCTTGGGGTTGAG 3'	338 ~500	Control interno RT-PCR Control interno PCR
qRab7-1F qRab7-1R	5' GCAACCATTGGAGCAGATTT 3' 5' ACGCCATGAATCGAGAGACT 3'	195	Expresión de LvRab7 qPCR
qLvan-40S_S24-F qLvan-40S_S24-R	5' CAGGCCGATCAACTGTCC 3' 5' CAATGAGAGCTTGCCTTTCC 3'	204	
qLvan-Ef-F qLvan-Ef-R	5' CTGTGGTCTGGTTGGTGTG 3' 5' TCGGATGAGTTCTTGGGTTC 3'	141	Genes de referencia
qLvan-UBIQ-F qLvan-UBIQ-R	5' GGGAAGACCATCACCCCTTG 3' 5' TCAGACAGAGTGCGACCATC 3'	146	qPCR
qLvan-L8-F qLvan-L8-R	5' GCCTAAGGTGCGTGGTGT 3' 5' ATTCTGCCTTGGGTCTTCT 3'	181	
qLvan-18S-F qLvan-18S-R	5' AGCAGGCTGGTTTTTGCTTA 3' 5' TATCTGATCGCCTTCGAACC 3'	186	

### **Extracción de DNA**

Para la extracción de DNA total en hemocitos o tejido se utilizó el kit comercial DNAzol (Invitrogen®) o GNENECLEAN SPIN Kit (Qbiogene) de acuerdo al procedimiento recomendado por el fabricante con algunas modificaciones. A continuación se describen los procedimientos utilizados en el presente estudio.

### **Aislamiento de hemocitos de camarón**

La hemolinfa se extrajo con jeringas de 1cm<sup>3</sup> para tuberculina. Para evitar que coagulara, las jeringas se cargaron con 300 µl de anticoagulante [SIC-EDTA (10 mM HEPES, 20 mM EDTA, 10 mM KCl, 450 mM NaCl)] antes de realizar la extracción. Se extrajeron 300 µl y se depositaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml que contenía otros 300 µl de anticoagulante (volumen final = 900 µl).

Se centrifugó la hemolinfa a 3,000 x g por 10 minutos a 4°C, se eliminó el plasma por decantación. Se centrifugó nuevamente por un minuto y se eliminó el plasma restante succionándolo con micro-pipeta.

### **Extracción de DNA en hemocitos de camarón con DNAzol**

Primero se separaron los hemocitos de la hemolinfa como se indicó anteriormente.

1. Se adicionaron 100 µl de DNAzol a los hemocitos y se maceraron con un homogeneizador manual. Una vez macerados se adicionaron 100 µl adicionales de DNAzol y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente (TA).
2. Se precipitó el DNA mediante la adición de 100 µl de etanol al 100% (frio = -20°C). Se mezcló con cuidado y se incubó por 3 minutos a TA.
3. Se centrifugó a 5,000 x g por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante.
4. Se lavó el DNA mediante la adición de 200 µl de etanol al 70%.
5. Se centrifugó a 1,000 x g por 2 minutos y se eliminó el sobrenadante.
6. Finalmente, el DNA fue disuelto en 30 µl de agua MiliQ.

### **Extracción de DNA en tejido de camarón con DNAzol**

1. Se tomaron 50 mg de tejido (Branquia, músculo o pleópodo), se les adicionaron 500  $\mu$ l de DNAzol y se maceraron con un homogeneizador manual.
2. Se precipitó el DNA mediante la adición de 250  $\mu$ l de etanol al 100% (frio =  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Se mezcló con cuidado y se incubó por 3 minutos a TA.
3. Se centrifugó a 5,000 x g por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante.
4. Se lavó el DNA mediante la adición de 500  $\mu$ l de etanol al 70%.
5. Se centrifugó a 1,000 x g por 2 minutos y se eliminó el sobrenadante.
6. Finalmente, el DNA fue disuelto en 30  $\mu$ l de agua MiliQ.

### **Extracción de DNA en hemocitos y tejido de camarón con GENE-CLEAN**

Primero se separaron los hemocitos de la hemolinfa como se indicó anteriormente.

1. Se agregaron 300  $\mu$ l de buffer de lisis (NaCl 100 mM, Tris 50 mM pH 8.0, EDTA 100 mM pH 8.0, SDS 1%) a 100 mg de tejido o al paquete de hemocitos.
2. Se maceraron y centrifugaron a 10,000 x g por 5 minutos.
3. Se tomaron 50  $\mu$ l del sobrenadante, se colocaron en un tubo nuevo y se les agregó 150  $\mu$ l de (GeneClean Glassmilk).
4. Se agitó enérgicamente por 10 segundos y se incubó a TA por 5 minutos.
5. Se centrifugó a 6,000 x g por un minuto para formar una matriz DNA-Glassmilk y se eliminó el sobrenadante.
6. Se adicionó 150  $\mu$ l de solución de lavado (New Wash) y se resuspendió la matriz.
7. Se centrifugó a 6,000 x g por un minuto y se eliminó el sobrenadante.
8. Se repitieron los pasos 6 y 7.
9. Se dejó secar por 10 minutos a TA, se adicionaron 30  $\mu$ l de agua MiliQ y se resuspendió la matriz.
10. Se centrifugó a 6,000 x g por un minuto, se recuperó el sobrenadante con pipeta y se almacenó en un tubo nuevo.

### **Análisis de PCR**

En el presente estudio, se realizaron análisis de PCR para verificar que los camarones experimentales no estuvieran infectados con WSSV antes de realizar los experimentos. Los oligonucleótidos usados para detectar WSSV están descritos en la Tabla I y las condiciones de amplificación fueron las mismas del RT-PCR (Figura 6).

### **Extracción de RNA**

Para la extracción de RNA total en hemocitos o tejido se utilizó el kit comercial TRIzol (Invitrogen®) de acuerdo al procedimiento recomendado por el fabricante con algunas modificaciones como se indica a continuación.

### **Extracción de RNA en hemocitos de camarón**

Para co-purificar RNA de hemolinfa, primero se separaron los hemocitos como se indicó arriba, posteriormente las muestras fueron procesadas como sigue:

1. Se le adicionaron 100  $\mu$ l de TRIzol a los hemocitos y se maceró con un homogeneizador manual. Una vez macerado se adicionaron 400  $\mu$ l mas de TRIzol.
2. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente (TA) por cinco minutos.
3. Se adicionaron 100  $\mu$ l de cloroformo y se homogenizó vigorosamente con la mano durante 15 segundos.
4. Se incubaron las muestras por 3 minutos y se centrifugaron a 12,000 x g durante 15 minutos a 4°C.
5. Se transfirió la fase superior (transparente) a otro tubo (~ 300  $\mu$ l).
6. Se adicionaron 250  $\mu$ l de isopropanol y se incubaron a TA por 10 minutos.
7. Se centrifugaron a 12,000 x g por 10 minutos a 4°C.
8. Se desechó el sobrenadante y se adicionaron 500  $\mu$ l de etanol al 75%.
9. Se mezcló con vortex por dos segundos y se centrifugaron a 7,500 x g durante 5 minutos a 4°C.
10. Se dejó secar la pastilla de RNA durante 5 minutos y se diluyó en 30  $\mu$ l de agua DEPC.
11. Las muestras fueron cuantificadas y almacenadas a -70 °C para su análisis.



### **Extracción de RNA en tejido de camarón**

1. Se colocaron ~50 mg de tejido en un tubo eppendorf de 1.5 ml
2. Se le adicionaron 800  $\mu$ l de TRIzol y se maceró con un homogeneizador manual.
3. Se centrifugó a 10,000 x g por 10 minutos a 4 °C.
4. Se recuperaron 500  $\mu$ l de TRIzol y se incubó a TA por cinco minutos

Posteriormente se continuó con el paso dos del protocolo con hemocitos.

### **Construcción de cDNA**

La construcción del cDNA se realizó con un kit comercial [(ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega)], con algunas modificaciones, como sigue:

Una vez cuantificados los RNAs se trataron 2  $\mu$ g con DNAsaI (invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. De estos se utilizó 1  $\mu$ g para retro-trascribir el DNA complementario (cDNA) como sigue:

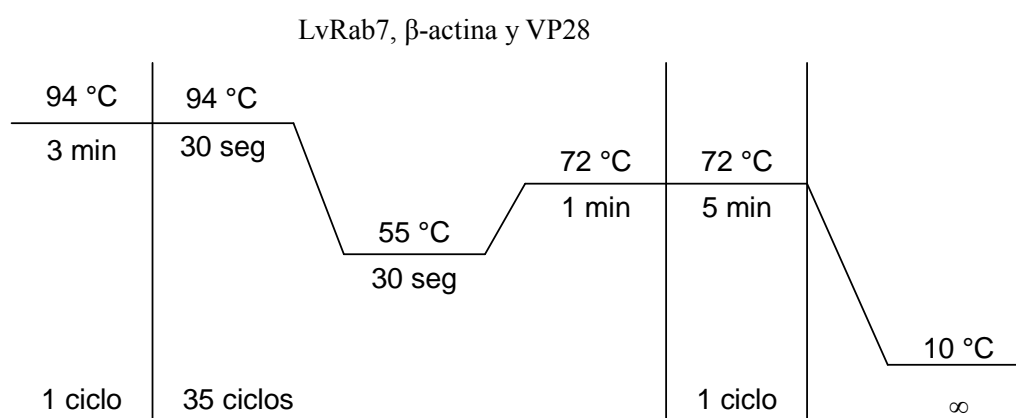
1. En un tubo eppendorf de 0.2 ml, se colocó 1  $\mu$ g de RNA total diluido en 5  $\mu$ l de agua y se le adicionó 1  $\mu$ l de oligo dT (25  $\mu$ M).
2. La mezcla se calentó a 70 °C por 5 minutos y se pasó inmediatamente a hielo.
3. Se incubó durante 5 minutos en hielo.
4. Durante el tiempo de incubación se preparó la mezcla de reactivos de la enzima. 2  $\mu$ l de buffer 5X, 0.5  $\mu$ l de  $MgCl_2$  50 mM, 1  $\mu$ l de dNTPs 20 mM, y 0.5  $\mu$ l de RT-ImProm II para cada reacción.
5. Se homogenizó la mezcla con vortex a baja potencia y se adicionaron 6  $\mu$ l a cada reacción para obtener un volumen final de 10  $\mu$ l.
6. Finalmente se sometieron a un ciclo de tres temperaturas como se indica a continuación: 5 minutos a 25 °C, 60 minutos a 42 °C y 15 minutos a 70 °C.
7. Los cDNAs fueron almacenados a -20 °C para su análisis.

Para verificar la expresión mediante RT-PCR se tomó 1  $\mu$ l de cDNA como templado y para medir la expresión mediante PCR cuantitativo, el cDNA se diluyó diez veces con agua MiliQ y se usaron 5  $\mu$ l como templado para cada reacción.

### RT-PCR

La detección del mRNA de los genes seleccionados para este estudio se realizó mediante el uso de diferentes combinaciones de Oligonucleótidos (Tabla I). Para disminuir la posibilidad de obtener falsos negativos, todas las muestras fueron verificadas mediante la amplificación de un fragmento del gen  $\beta$ -actina de camarón.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un tubo Eppendorf de 0.2 ml con una mezcla de reacción de 18  $\mu$ l de agua miliQ, 2.5  $\mu$ l Buffer para PCR 10X, 1.0  $\mu$ l de  $MgCl_2$  50 mM, 0.3  $\mu$ l dNTPs 10 mM, 1.0  $\mu$ l de cada Primer (10  $\mu$ M), 0.2  $\mu$ l TaqDNApolimerasa Platinum (Invitrogen) 5U/ $\mu$ l y 1  $\mu$ l de cDNA para un volumen total de 25  $\mu$ l. Para amplificar cada fragmento se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación:



### RT-PCR Cuantitativo

Para analizar la expresión de LvRab7 en los camarones experimentales, todas las reacciones de PCR cuantitativo (qPCR) se realizaron por duplicado o triplicado en placas de 96 pozos cubiertas con una película adhesiva (Bio-Rad), en un termociclador [(CFX96 Real-Time PCR detection system)(Bio-Rad)]. La mezcla de reactivos de PCR fue

cuidadosamente preparada en el laboratorio. Cada reacción contuvo los siguientes reactivos aforando a un volumen final de 15  $\mu$ l con agua miliQ.

- 3  $\mu$ l de Buffer 5X
- 1.5  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (25mM)
- 0.3  $\mu$ l de dNTPs (40  $\mu$ M)
- 0.7 ó 0.3  $\mu$ M de cada Primer
- 0.45 U de GoTaq® Flexi DNAPolimerase (Promega No. Cat. M8295)
- 1X EvaGreen Fluorecent dye (Biotium CA No. Cat. 31000)
- 5  $\mu$ l de cDNA

Con la finalidad de eliminar variaciones técnicas en los resultados. La mezcla de reactivos fue preparada de una sola vez (Mastermix) en un mismo tubo para todas las muestras a analizar. Finalmente se distribuyó en alícuotas que fueron mantenidas a -20 °C hasta su uso. Las condiciones de amplificación se muestran a continuación (figura 7). La fluorescencia fue registrada a 79 °C después de la elongación.

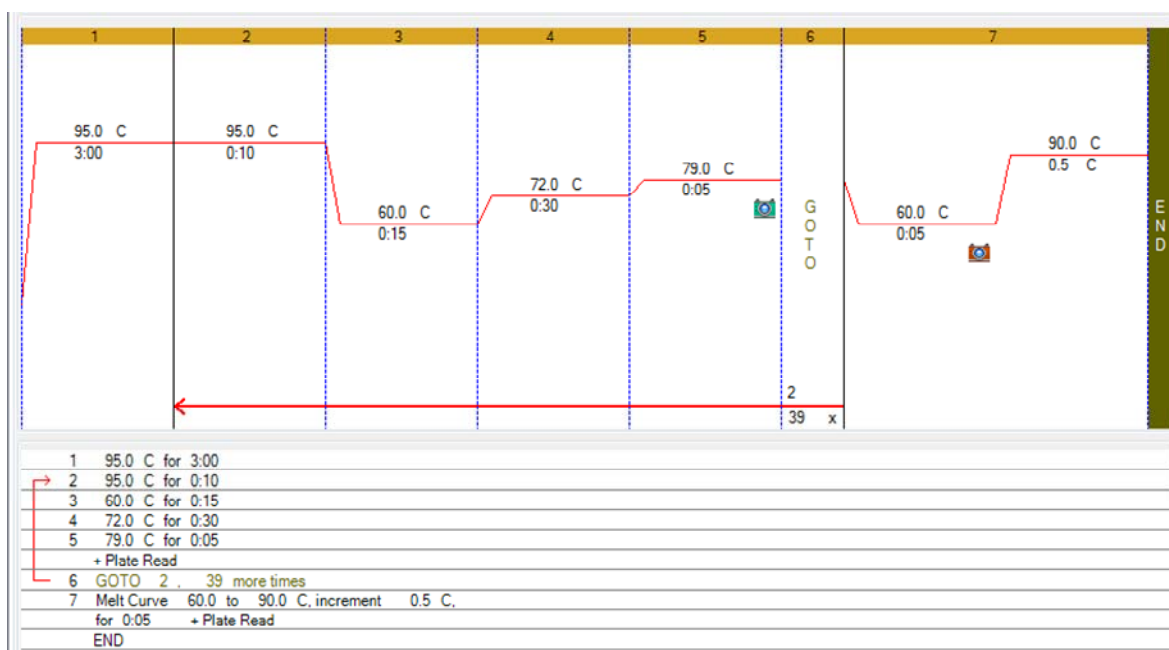


Figura 7. Condiciones de amplificación del PCR cuantitativo utilizadas en este estudio.

Al final de cada reacción se desarrolló una curva de disociación donde se registró la fluorescencia cada 0.5 °C desde 60°C hasta 90 °C para descartar la formación de artefactos inespecíficos en las reacciones.

La eficiencia de las reacciones fue determinada mediante el cálculo de una pendiente con cinco diluciones seriales de un pool de cDNA de todas las muestras experimentales.

Se analizaron nueve genes putativos de referencia mas el de LvRab7 con diez pares de Oligonucleótidos para determinar su eficiencia. De aquí, se seleccionaron cinco de genes de referencia en *Litopenaeus vannamei* (40S-S24, Elongation Factor, Ubiquitina, L8 y 18S-RNA ribosomal) y un par de oligonucleótidos del gen de interés LvRab7(Tabla I) para analizar todas las muestras experimentales. Los datos de Cq obtenidos de todas las muestras fueron sometidos a un análisis de estabilidad con “geNorm y Norm Finder” de acceso libre en Internet (<http://www.leonxie.com>).

Después del análisis de estabilidad se seleccionaron los genes 40S-S24, Elongation Factor y Ubiquitina para normalizar los datos obtenidos con LvRab7.

La abundancia relativa de transcritos de los genes de referencia se estimaron mediante la ecuación  $E(\Delta Cq)$  donde E=la eficiencia del gen específico y  $\Delta Cq$  es diferencia de medias entre los valores de Cq obtenidos,

### **Aislamiento de *Litopenaeus vannamei* Rab7 (LvRab7)**

La secuencia del Marco de Lectura Abierta (ORF) de Rab7 en *Litopenaeus vannamei* fue amplificada del mRNA mediante RT-PCR con Oligonucleótidos diseñados en secuencias de PmRab7 (Gene-Bank accession DQ231062) y MjRab7 (Gene-Bank accession AB379643). Se extrajo RNA de hemolinfa, branquias y músculo de reproductores sanos de *L. vannamei* con Trizol (Invitrogen). El cDNA fue sintetizado con el Kit comercial [ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega)] y oligo dT como se indicó anteriormente. Los fragmentos obtenidos de los tres tejidos (~600 pb) fueron clonados en un plásmido (pGEM-T Easy de Promega) e introducidos en células competentes (*E. coli* aislado JM109 de Promega). Finalmente las clonas se enviaron a la compañía GENEWIZ (USA) para ser secuenciadas. Las secuencias fueron comparadas con las de otras especies mediante BLAST y BLASTX.

### Síntesis de RNA de doble cadena (dsRNA)

El dsRNA fue sintetizado con el Kit comercial (Block-iT RNAi TOPO Transcription Kit; Invitrogen) con algunas modificaciones al protocolo original de la compañía.

A continuación se describe el proceso detallado para la construcción de los dsRNA que fueron utilizados para silenciar LvRab7 en este estudio.

1. Se amplificó el fragmento de ADN correspondiente a la secuencia de LvRab7 mediante PCR utilizando una clona como templado. [Asegurarse que al final se le dé un tiempo de 7 minutos de extensión].
2. El producto de PCR se corrió un gel de agarosa al 1%. Para estimar la cantidad de producto de PCR se corrieron uno, tres y 5  $\mu\text{l}$  del producto por separado a un lado de una alícuota de un medidor de masas [High DNA Mass Ladder (Invitrogen Cat No 1049-016)]. Se diluyó el producto de PCR a 100 ng/ $\mu\text{l}$ .

Aunque el producto de PCR se puede almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ , es importante usarlo lo más pronto posible.

3. Se unió el producto de PCR a un promotor T7 en una reacción de 6  $\mu\text{l}$ , para lo cual se colocaron en un tubo eppendorf de 0.2 ml los siguientes reactivos.

Producto de PCR	1 $\mu\text{l}$
Solución de sales	1 $\mu\text{l}$
Agua estéril	3 $\mu\text{l}$
BLOCK-iT T7-TOPO linker	1 $\mu\text{l}$

Se mezcló lentamente con la pipeta, se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por exactamente 15 minutos y se pasó el tubo a hielo. (Es importante no incubar por más de 15 minutos).

De esta manera, la secuencia del promotor T7 se une a los extremos 5' del producto de PCR.

4. Se realizaron dos reacciones de PCR secundarias (25  $\mu\text{l}$ ) para lo cual se usó como templado el producto ligado a T7. Una reacción se realizó con el Primer específico

Forward y un Primer que se une a la secuencia del promotor T7 (Primer T7). La otra reacción se realizó con el Primer específico Reverse y el Primer T7.

De esta manera, en una reacción se obtuvo DNA con la secuencia T7 unida a la cadena Forward y en la otra T7 unido a la cadena Reverse

5. Se visualizaron y cuantificaron los productos de PCR del mismo modo que en el paso 3. Se diluyeron los productos a 100 ng/ $\mu$ l. (debe haber por lo menos 25 ng/ $\mu$ l)

Es importante que se visualice una sola banda en el gel. Algunas reacciones que presentaron doble banda produjeron cantidades muy bajas de RNA.

6. Se realizaron las reacciones de transcripción de RNA por separado, para lo cual se mezclaron los siguientes reactivos en este orden para cada reacción:

Agua libre de RNAsas -----	12 $\mu$ l
NTPs (75 mM) -----	8 $\mu$ l
DNA templado (100 ng/ $\mu$ l)-----	10 $\mu$ l
Adicionar el buffer de transcripción 10 X ----	4 $\mu$ l
BLOCK-iT T7 (Enzyme Mix) -----	6 $\mu$ l

7. Se incubaron las reacciones a 37°C por 6 horas. Después se adicionó 2  $\mu$ l de DNAsa I a cada reacción y se incubaron a 37°C por 15 minutos.
8. Se purificaron por separado los transcritos de RNA de cadena sencilla ssRNA con columnas.

[Antes de comenzar, se tomó una alícuota de “RNA binding buffer” y se le adicionó 1 % de  $\beta$ -mercaptoetanol v/v. (esta mezcla se prepara inmediatamente antes de usarse)]

- a) Se adicionaron 160  $\mu$ l de “RNA Binding Buffer con  $\beta$ -mercaptoetanol” a cada reacción (Volumen final = 200  $\mu$ l).
- b) Se adicionaron 100  $\mu$ l de etanol al 100% (Volumen final = 300  $\mu$ l)
- c) Se mezcló con pipeta 5 veces
- d) Se colocó la mezcla en una columna (incluidas en el kit) y se centrifugó a 14,000 x g por 15 segundos a TA y se eliminó el líquido del contenedor de la columna

- e) Se lavó el RNA mediante la adición de 500  $\mu$ l de “RNA Wash Buffer 1X”. Se centrifugó a 14,000 x g por 15 seg y se eliminó el líquido del contenedor de la columna.
  - f) Se repitió el paso “e”
  - g) Se eliminaron restos de Buffer centrifugando a 14,000 x g por 1 minuto a TA.
  - h) Para recuperar el ssRNA, se adicionaron 40  $\mu$ l de agua libre de RNAsas a la columna y esta se colocó en un tubo de 1.5 ml (Tubo colector), se incubó por 1 minuto y se centrifugó a 14,000 x g por 2 minutos a TA.
  - i) Para obtener la mayor cantidad posible de ssRNA se adicionaron otros 40  $\mu$ l de agua a la columna y se centrifugaron nuevamente para obtener un volumen final de 80  $\mu$ l.
  - j) Finalmente se adicionaron 1.6  $\mu$ l de “RNA annealing Buffer 50X”. y se determinó su concentración.
9. Una vez cuantificados las cadenas de RNA Forward y Reverse se hibridaron para generar los RNAs de doble cadena (dsRNA) como sigue:
- Antes de iniciar se calentaron 250 ml de agua en un vaso de precipitados de 500 ml hasta hervir.
- a) Se colocaron en un tubo de 1.5 ml, cantidades iguales de ssRNA Forward y Reverse.
  - b) Se colocó el tubo con la mezcla de ssRNAs a baño maría en el agua caliente durante 90 minutos. (hasta que bajó la temperatura a TA).
  - c) Se verificó la integridad del dsRNA en un gel de agarosa y se almacenó a -70 °C en alícuotas de 100  $\mu$ g.

### **Tamaños de RNA de doble cadena para silenciar LvRab7**

Se construyeron dos fragmentos de dsRNA para silenciar LvRab7. Para verificar si hay un efecto relacionado al tamaño de dsRNA, se sintetizaron dos fragmentos, uno con una

secuencia parcial del ORF LvRab7 de 494 pb (del nucleótido 124 al 618 del OFR) y otro con la secuencia completa del ORF (618 pb).

### **Inóculo viral**

Se preparó un inóculo viral para todos los experimentos de este trabajo. El virus fue aislado de camarones infectados experimentalmente. La elaboración del inóculo viral se realizó conforme a la metodología descrita por Escobedo-Bonilla et al., (2005). Una vez que los camarones infectados presentaron signos evidentes de la enfermedad fueron sacrificados, se les retiró el hepatopáncreas y el exoesqueleto junto con los pleópodos y pereiópodos. El tejido restante fue congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta que se colectaron todos los camarones para el inóculo. Posteriormente, el tejido fue homogenizado en diez volúmenes de búfer de fosfatos (PBS 2X), se maceró y se centrifugó a  $3000 \times g$  por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se centrifugó a  $13000 \times g$  por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se filtró a  $0.45 \mu\text{m}$ , se formaron alícuotas de  $800 \mu\text{l}$  y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Antes de la titulación o de cualquier experimento, se descongeló una alícuota en hielo y se diluyó de acuerdo a las necesidades del experimento. Las diluciones se realizaron con Buffer PBS 2X.

### **Titulación *in vivo* del inóculo de WSSV**

Para determinar el título infeccioso del inóculo se utilizó el método de Reed y Muench (1938) mediante infecciones experimentales con diluciones del inóculo obtenido. Se prepararon seis diluciones seriales ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ ) con PBS 1X. Cada una de las diluciones fue utilizada para inocular cinco camarones, mediante la inyección de  $100 \mu\text{l}$  de la dilución a cada organismo, después se colocaron individualmente en tanques de 15 L con aireación constante. Los signos clínicos fueron monitoreados dos veces al día por cinco días. Los camarones muertos o moribundos fueron retirados para verificar mediante PCR la presencia de WSSV. Al final de los cinco días los camarones sobrevivientes fueron sacrificados y analizados del mismo modo. Las diluciones que provocaron la mortalidad en



menos del 50% de los camarones inoculados y en la última que provocó más de 50% nos indicaron el título del inóculo original.

Esta metodología de titulación nos permite determinar la concentración del inóculo en Dosis Infecciosas. Una dosis infecciosa según Reed y Muench (1938) se expresa como la dosis o cantidad del inóculo suministrado que produce efecto (en este caso la muerte por WSSV) en el 50 % de las unidades en prueba (camarones inyectados). Aunque la cuantificación de viriones mediante PCR en tiempo real es muy socorrida para determinar títulos virales, tiene la desventaja de que cuenta solamente las copias de un segmento del genoma viral en el inóculo, sin importar si las copias son infecciosas o no. Además, existen diferentes cepas del WSSV que presentan virulencias distintas y por lo tanto, la cantidad de partículas virales necesarias para desencadenar una infección puede ser variable. Las Dosis Infecciosas nos permiten homologar la infectividad de las diferentes cepas de virus porque lo que se mide es la respuesta *in vivo* del inóculo y por lo que, las partículas no infectivas no cuentan.

El título viral del inóculo utilizado en este estudio fue de  $10^{6.2}$  dosis infecciosas (DI) por ml. Para los experimentos se seleccionaron 2500, 25 o 20 DI contra los camarones tratados con dsRNA-LvRab7 y los controles positivos.

### **Evaluación del efecto antiviral mediante RNAi inducido con una secuencia parcial y total de dsRNA-LvRab7 en reproductores de camarón**

#### **Camarones experimentales**

Se obtuvieron 250 camarones con tamaño de reproductores provenientes de una granja comercial en el municipio de Guasave, Sinaloa con un peso de  $27.5 \pm 2.5$  g. Los camarones fueron transportados a las instalaciones del CIIDIR-Sinaloa en un tinaco de 1,100 L que contenía 500 L de agua con dos líneas de aireación constante. El tiempo de transporte fue de dos horas, desde el inicio de la captura de los organismos hasta que fueron colocados en las tinas de aclimatación. Los camarones fueron aclimatados a 25 UPS y  $27 \pm 1$  °C de temperatura en una tina de 2000 L provista con cuatro filtros biológicos externos que proveyeron un reflujo constante de agua filtrada, impulsada por aireación. Se mantuvieron

bajo observación durante siete días alimentándolos con alimento comercial dos veces al día. Durante este tiempo, todos los camarones fueron analizados por PCR para descartar la presencia de WSSV con los Oligonucleótidos WSSV-VP28-F1/ WSSV-VP28-R1 (Tabla I). La verificación se llevó a cabo con DNA extraído de hemolinfa, como se indicó anteriormente.

### **Condiciones experimentales**

Todos los experimentos de reto se realizaron con agua de mar estéril, a 25 UPS y  $27 \pm 1$  °C de temperatura. Como unidades experimentales se utilizaron tinas de plástico de 100 L con una línea de aireación continua y un difusor de aire. Los camarones fueron colocados en cada unidad experimental 24 horas antes de iniciar los tratamientos. Durante el experimento, se recambió 50% de agua a todas las unidades experimentales cada dos días.

### **Diseño experimental**

Para evaluar y comparar el efecto antiviral del fragmento de dsRNA-LvRab7 parcial (494 pb) contra el completo (618 pb), los camarones fueron tratados con 4 $\mu$ g de dsRNA contenidos en 100 $\mu$ l de Buffer PBS 2X. El tratamiento y la infección se llevó a cabo por inyección intramuscular entre el tercero y cuarto segmentos abdominales de los organismos.

Se inyectaron 30 camarones con dsRNA-LvRab7 parcial y se colocaron equitativamente en tres unidades experimentales. Debido a la complejidad de trabajar con 30 organismos por tratamiento, para probar el fragmento completo se inyectaron 15 camarones con dsRNA-LvRab7 completo y se colocaron equitativamente en tres unidades experimentales. Al mismo tiempo 15 camarones seleccionados como controles positivos fueron inyectados sólo con PBS y colocados equitativamente en tres unidades experimentales. Finalmente 15 camarones adicionales, fueron usados como control negativo y colocados intactos en tres unidades experimentales.

Dos días después del tratamiento [días post tratamiento (dpt)], los camarones tratados y los controles positivos fueron inoculados con 2500 DI de WSSV y se le dio seguimiento al

experimento por diez días después de la infección [días post infección (dpi)]. El diseño experimental se muestra a continuación en la Tabla II.

Tabla II. Diseño experimental para comparar del efecto contra WSSV de dos fragmentos de dsRNA de diferente tamaño

Tretamiento	Tamaño de dsRNA (pb)	dsRNA/camarón ( $\mu$ g)	Camarones	Réplicas	WSSV (DI/camarón)
dsRNA-LvRab7 parcial	494	4	30	3	2500
dsRNA-LvRab7 completo	618	4	15	3	2500
Control positivo	Sin dsRNA	Sin dsRNA	15	3	2500
Blanco	Sin dsRNA	Sin dsRNA	15	3	Sin virus

Los signos clínicos de WSSV y la mortalidad fueron registrados dos veces al día. Los camarones muertos o moribundos fueron colectados y procesados para confirmar la presencia de WSSV mediante PCR con los Oligonucleótidos WSSV-VP28-F1/WSSV-VP28-R1 (Tabla I). Finalmente los camarones sobrevivientes a diez dpi fueron sacrificados y procesados para descartar la replicación viral mediante RT-PCR.

### **Evaluación del efecto antiviral con diferentes dosis de dsRNA contra diferentes dosis virales.**

Para realizar este experimento, se utilizaron camarones del mismo lote del experimento anterior, bajo las mismas condiciones experimentales.

### **Diseño del experimento**

Los camarones fueron tratados con 4 o 20 $\mu$ g de dsRNA-LvRab7 (618 pb) por organismo. El tratamiento y el virus fueron suministrados en 100 $\mu$ l de Buffer PBS 2X mediante

inyección intramuscular entre el tercero y cuarto segmentos abdominales de los organismos.

Se inyectaron 33 camarones con 4 $\mu$ g dsRNA y 33 con 20 $\mu$ g. Posteriormente fueron repartidos en grupos de cinco y los tres restantes de cada tratamiento fueron colocados en un contenedor cada uno y fueron utilizados para medir el efecto del silenciamiento de LvRab7 en camarones tratados y no infectados.

Al mismo tiempo 30 camarones usados como controles positivos fueron inyectados sólo con PBS y colocados equitativamente en seis unidades experimentales. Finalmente 15 camarones adicionales, fueron usados como control negativo y colocados intactos en tres unidades experimentales.

Dos días después del tratamiento [días post tratamiento (dpt)], los camarones tratados y los controles positivos fueron inoculados con 25 o 2500 DI de WSSV y se le dio seguimiento al experimento por diez días después de la infección [días post infección (dpi)]. El diseño experimental se muestra a continuación en la Tabla III.

Tabla III. Diseño experimental para evaluar el efecto antiviral de dos dosis de dsRNA-LvRab7 contra una dosis alta y una baja del virus de la mancha blanca.

<b>Tratamiento</b>	<b>dsRNA (<math>\mu</math>g/camarón)</b>	<b>Camarones</b>	<b>WSSV Dosis Infecciosas</b>
1	4	15	25
2	4	15	2500
3	20	15	25
4	20	15	2500
Control (-)	4	3	Sin virus
Control (-)	20	3	Sin virus
Control (+)	Sin dsRNA	15	25
Control (+)	Sin dsRNA	15	2500
Blanco	Sin dsRNA	15	Sin virus

Los signos clínicos de infección y la mortalidad fueron monitoreadas dos veces al día. Los camarones muertos o moribundos fueron removidos. Se tomaron muestras de branquia de cada organismo y se almacenaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis de PCR. A los diez días post infección los camarones sobrevivientes fueron sacrificados y almacenados a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis por PCR y RT-PCR.

Para evaluar el efecto del silenciamiento, se realizaron análisis de RT-PCR en hemolinfa de tres camarones de los diferentes tratamientos con dsRNA y de los controles negativos. Para determinar el nivel basal de expresión, se tomaron muestras de los mismos organismos 24 horas antes del tratamiento y para registrar el silenciamiento se tomaron muestras a las 24, 72 y 120 hpt. Las reacciones de RT-PCR para detectar LvRab7 se realizaron con los Oligonucleótidos LvRab7-F1/R2 que amplifican un fragmento de 399 pb y para determinar la integridad y calidad del cDNA todas las muestras fueron analizadas con oligonucleótidos de  $\beta$ -actina que amplifican un fragmento de 338 pb en mRNAs (Tabla I).

### **Duración del efecto contra WSSV inducido por el silenciamiento de LvRab7 en reproductores de *Litopenaeus vannamei***

#### **Camarones experimentales**

Se obtuvieron 300 reproductores de *L. vannamei* con un peso promedio de  $27 \pm 4$  g de un laboratorio de producción de postlarvas en Huatabampo, Sonora, México. Los camarones fueron transportados a las instalaciones del CIBNOR en Guaymas, en un tanque de 1,100 litros con 800 L de agua de mar filtrada y con una línea de oxígeno conectada a un difusor. Durante el trayecto de cuatro horas, se les agregó hielo periódicamente en el tanque de transporte, para mantener la temperatura entre 25 y 28  $^{\circ}\text{C}$ . A su arribo a las instalaciones del CIBNOR Unidad Guaymas, los organismos fueron colocados en dos tinas de 2000 L con agua de mar (1800 L). Posteriormente fueron aclimatados a 25 UPS y mantenidos a  $27 \pm 1$   $^{\circ}\text{C}$  de temperatura, se alimentaron con alimento comercial dos veces al día y permanecieron en observación bajo estas condiciones durante diez días antes de iniciar los experimentos.

Durante este tiempo, se analizaron 30 camarones seleccionados aleatoriamente para descartar la presencia de WSSV antes de los experimentos. La verificación se realizó mediante PCR en hemolinfa, con los Oligonucleótidos (VP28-F3/VP28-R3) (Tabla I).

### **Condiciones experimentales**

Todos los experimentos fueron realizados en cámaras de temperatura controlada a  $27 \pm 0.1$  °C, con agua de mar estéril a 25 UPS. Las unidades experimentales consistieron en tanques de plástico de 80 L con tapa. Para evitar el recambio de agua, cada tanque fue provisto de un filtro de arena con recirculación permanente impulsada por aireación. Para cada ensayo de reto se colocaron cinco camarones por grupo en cada unidad experimental y se aclimataron durante 24 horas antes de iniciar los experimentos. Cada experimento fue realizado por triplicado. Los camarones fueron alimentados *ad-libitum* en dos raciones al día.

### **Diseño experimental (Duración del efecto antiviral)**

En este experimento, el tratamiento consistió en 5 µg de dsRNA-LvRab7 y el reto fue contra 20 DI de WSSV, ambos contenidos en 100 µl de buffer PBS 1X. El tratamiento y el virus fueron suministrados mediante inyección por vía intramuscular entre el tercer y cuarto segmentos abdominales.

Inicialmente, los camarones reproductores fueron separados en tres grupos: Grupo (a) 75 camarones para los tratamientos (inyectados con 5µg de LvRab7-dsRNA), (b) 75 camarones usados como controles positivos (inyectados con 100µl de PBS-1X) y (c) 150 camarones intactos (usados como blanco). Este momento fue registrado como [cero días post tratamiento (0 dpt)].

A los siete dpt se colocaron por separado 15 camarones de los grupos (a) y (b) en tanques de 80 L y se les inyectaron 20 SID<sub>50</sub> de WSSV contenidos en 100µl de PBS 1X. Se realizaron tres réplicas por cada tratamiento. Además, se utilizaron cinco camarones del grupo (c) como blanco (Tabla IV). Este experimento se mantuvo por diez días sin recambio de agua, se alimentó a los camarones y se monitoreó la mortalidad dos veces al día.

Los camarones moribundos o muertos durante los experimentos fueron colectados y procesados para su análisis. A los diez días post infección (dpi), los sobrevivientes fueron sacrificados y procesados para su análisis.

Se realizaron experimentos idénticos de infección con WSSV con animales de los mismos grupos a los 14 y 21 dpt (Tabla IV).

Tabla IV. Diseño experimental para evaluar la duración del efecto contra WSSV inducido mediante el silenciamiento de LvRab7 en reproductores de *L. vannamei*.

Tratamiento No.	Descripción del tratamiento	dsRNA (µg/camarón)	WSSV (DI)	camarones	Réplicas
1	Camarones a 7 días del tratamiento	5	20	5	3
2	Camarones a 14 días del tratamiento	5	20	5	3
3	Camarones a 21 días del tratamiento	5	20	5	3
4	Control (+) del tratamiento 1	Sin dsRNA	20	5	3
5	Control (+) del tratamiento 2	Sin dsRNA	20	5	3
6	Control (+) del tratamiento 3	Sin dsRNA	20	5	3
7	Control (-) del tratamiento 1	Sin dsRNA	Sin virus	5	1
8	Control (-) del tratamiento 2	Sin dsRNA	Sin virus	5	1
9	Control (-) del tratamiento 3	Sin dsRNA	Sin virus	5	1

#### **Evaluación del efecto contra WSSV al final del periodo reproductivo en hembras reproductoras de *L. vannamei* que fueron inoculadas con dsRNA-LvRab7 después de la ablación.**

La primera parte de este experimento fue realizada en las instalaciones del laboratorio de producción de postlarvas YAMETO. Este laboratorio se encuentra en el poblado Yameto del municipio de Navolato en el estado de Sinaloa.

El tratamiento consistió en 4 µg de dsRNA-LvRab7 por hembra de camarón.

Para una mejor comprensión de este experimento, primero se presenta una breve descripción de las actividades que se desarrollaron en el proceso de reproducción de camarón blanco en las instalaciones del laboratorio, con énfasis en los puntos donde se trató a los organismos con dsRNA-LvRab7 y donde se colectaron las muestras.

### **Obtención de camarones para la reproducción**

Las postlarvas que fueron utilizadas como reproductores se mantuvieron en canales de flujo constante de agua (Raceways) durante 9 a diez meses hasta alcanzar un peso de 30 a 35 gramos. Una vez alcanzada esta talla, las hembras y machos fueron considerados reproductores.

### **Aclimatación de los reproductores**

El proceso de reproducción inició al trasladar a los reproductores (hembras y machos por separado) a tanques de maduración. Ambos, hembras y machos permanecieron ahí durante 15 días para aclimatarse.

### **Ablación de las hembras**

El proceso de ablación de las hembras se llevó a cabo al efectuar una incisión en un ojo con una navaja de afeitar. En ese momento, los tanques donde se encontraban las hembras fueron catalogados como tanques de ablación. Las hembras permanecieron ahí 8 días para que se recuperaran de la lesión. Transcurrido este tiempo, se juntaron con los machos en una proporción 1:1. Algunas hembras permanecieron solas en tanques separados para reponer a las que se murieron durante el proceso. Durante esta fase, se seleccionaron las hembras experimentales. Se inocularon 58 hembras con 4µg de dsRNA-LvRab7 cada una y se colocaron con 58 machos en un tanque de maduración. Al mismo tiempo, las hembras sin tratamiento fueron juntadas con los machos en otros tanques de maduración (Figura 8).





Figura 8. Tanque de maduración y hembras de camarón blanco inoculadas con dsRNA

### **Parchado de las hembras**

Una vez juntos, hembras y machos, se dio el cortejo y el parchado de las hembras. Esta fase consistió en que algunos machos colocaron el espermátforo entre el tercero y quinto par de pereiópodos de las hembras. Este proceso se lleva a cabo durante todo el tiempo de reproducción y las hembras parchadas se colectan únicamente cuando se requiere obtener crías. Para este estudio, las hembras tratadas y sin tratamiento fueron colectadas a los 12 días post tratamiento (dpt), entre las 18:00 y 20:00 horas.

Con la finalidad de verificar el efecto en los animales tratados, un segundo grupo de hembras fue colectado el día 22 post tratamiento.

### **Desove**

Las hembras parchadas fueron colocadas para desovar en un tinaco de 450 L con agua de mar filtrada (Figura 9). El desove ocurrió ese mismo día entre las 11 y las 12 PM. Posteriormente las hembras desovadas se regresaron a los tanques de maduración para reiniciar el proceso de maduración de la gónada.

### **Colecta de huevos**

Los huevos fueron colectados al drenar el tanque hacia un contenedor de 20 L con dos ventanas revestidas de maya de 100  $\mu$ m. Para evitar que los huevos fueran dañados por el golpe de agua, el contenedor de 20 L se colocó dentro de otro contenedor (Figura 9).



Figura 9.- tinacos utilizados para el desove de las hembras de camarón y contenedor para recuperar los huevos.

Una vez colectados, se desinfectaron con carbón activado y se lavaron varias veces. Se tomaron dos muestras de huevos, una proveniente de hembras tratadas y otra de hembras no tratadas. Las muestras fueron fijadas con solución de Davidson's para visualizar su morfología. Este proceso duró hasta las 4 AM.

### **Eclosión**

Posteriormente, los huevos se pasaron a un tanque de 1000 L para que eclosionaran, manteniéndolos ahí por 8 horas. A las 12 AM se colectaron los nauplios y se cuantificaron. Del mismo modo que con los huevos, los nauplios colectados se concentraron en 20 litros de agua y se transfirieron a tanques de 400 L con fondo cónico donde permanecieron durante 24 horas. Durante este tiempo los nauplios desarrollaron los cinco estadios de nauplio.

Se tomaron dos muestras de nauplios, una proveniente de hembras tratadas y otra de hembras no tratadas. Las muestras fueron fijadas con solución de Davidson's para visualizar su morfología.

### **Desarrollo larvario**

Finalmente los nauplios desarrollados se colectaron y se transfirieron a dos tanques en donde completaron su desarrollo hasta llegar a la etapa de postlarvas.

Se tomó un lote de 10,000 postlarvas provenientes de las hembras tratadas y otro lote igual de hembras sin tratamiento. Estos animales fueron mantenidos hasta juveniles para realizar experimentos de reto contra WSSV.

### **Diseño experimental [Reto de hembras tratadas después del periodo reproductivo 83 (dpt)]**

Una vez finalizado el periodo de producción, los reproductores (hembras y machos) fueron trasladados a las instalaciones del CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa.

Los reproductores fueron transportados en contenedores por separado suministrándoles oxígeno durante el trayecto de cuatro horas aproximadamente.

Ya en las instalaciones del CIIDIR, los organismos fueron aclimatados en tinas de 2000 lt. Con la finalidad de mantener la buena calidad del agua el mayor tiempo posible en las tinas de aclimatación, se construyeron filtros externos de grava y arena con un flujo constante de agua en un sistema cerrado. Ahí permanecieron por un periodo de 15 días para su aclimatación.

Cabe señalar que las hembras llegaron en muy malas condiciones, debido presuntamente al manejo al que fueron sometidas durante el periodo reproductivo en el laboratorio.

Los organismos del tratamiento y los controles positivos fueron inoculados vía intramuscular con una dosis muy alta del virus de la mancha blanca [62,000 Dosis infecciosas (DI)](Escobedo-Bonilla et al., 2005 y 2006) diluida en 100 µl de buffer PBS2X y aplicada mediante una inyección entre el tercero y cuarto segmentos abdominales.

Se colocaron 20 camarones tratados con dsRNA en cinco tanques de 100 L y 12 camarones sin tratamiento en dos tanques. 24 horas después, todos los camarones tratados y seis sin tratar fueron inoculados con el virus. En este momento los organismos reproductores tenían 83 días de haber sido tratados con el dsRNA. Este experimento se mantuvo hasta que los camarones tratados y los controles positivos alcanzaron el 100% de mortalidad (Figura 10).

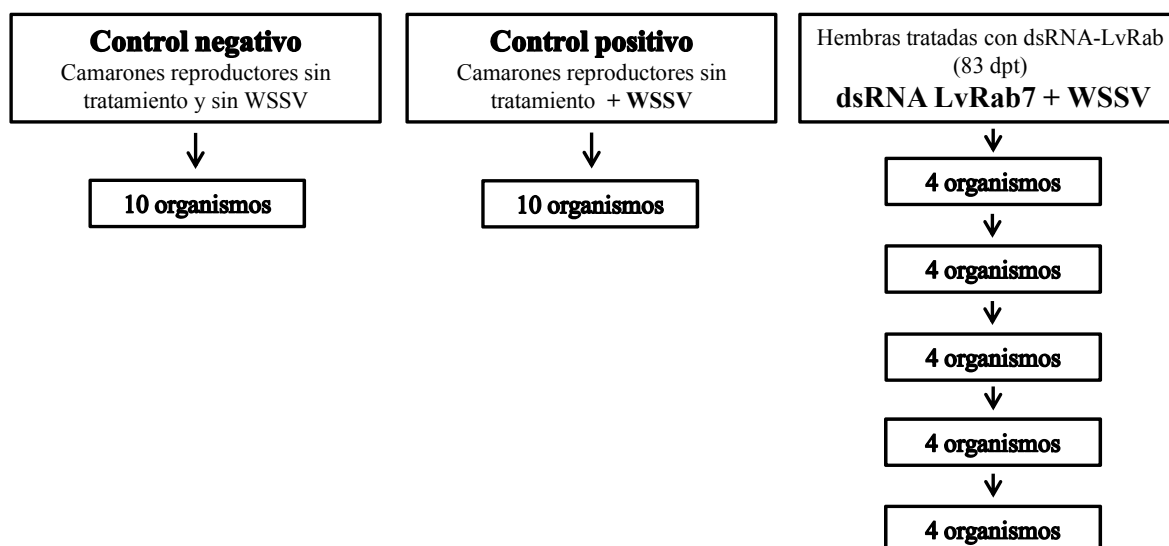


Figura 10.- Diseño del bioensayo para retar a las hembras tratadas con dsRNA-LvRab7 contra el virus de la mancha blanca a los 83 días post tratamiento.

Durante el bioensayo, los organismos fueron mantenidos en agua de mar a 25 UPS y 28 °C de temperatura, con recambio de agua de 90% cada tercer día.

Como el periodo en el que se presentó la mortalidad fue muy corto, algunos organismos no se pudieron recuperar frescos, por lo que no se les tomaron muestras para extracción de RNA, de los demás se tomaron muestras de tejido y fueron fijadas con RNA-later y etanol 96% para su posterior análisis. El material sobrante fue congelado a -70°C.

### **Evaluación de la respuesta antiviral en la progenie de reproductores tratados con dsRNA-Rab7**

#### **Camarones experimentales**

Los lotes de 10,000 postlarvas provenientes de reproductores tratados con dsRNA-LvRab7 y sin tratamiento, fueron mantenidos en las instalaciones del laboratorio YAMETO hasta que llegaron a los tres gramos de peso.

Una vez alcanzada esa talla, se transportaron 500 organismos de cada lote a las instalaciones del CIIDIR-Sinaloa, separados en dos tinacos de 450 L que contenían 300 L de agua. El agua en cada contenedor de transporte fue oxigenada con un difusor de aire conectado a un tanque de oxígeno. El tiempo de transporte fue de cinco horas desde el inicio de la captura de los organismos hasta que fueron colocados en las tinas de aclimatación. Cada lote de camarones fue aclimatado a 30 UPS y  $28 \pm 1$  °C de temperatura en una tina de 2000 L provista con dos filtros biológicos externos que proveyeron un flujo constante de agua filtrada, impulsada por aireación.

Se mantuvieron bajo observación durante 15 días alimentándolos con alimento comercial dos veces al día. Durante este tiempo, el 6% de los camarones fueron analizados por PCR para descartar la presencia de WSSV con los Oligonucleótidos WSSV-VP28-F1/ WSSV-VP28-R1 (Tabla I). La verificación se llevó a cabo con DNA extraído de branquias usando DNAzol como se indicó arriba.

### **Infección intramuscular en la progenie**

Los tratamientos consistieron en 30 organismos provenientes de hembras tratadas que fueron colocados equitativamente en tres tinas de 100 L. Además se colocaron 20 camarones provenientes de reproductores sin tratamiento en dos tinas de 100 L que fueron usados como control positivo y negativo (Figura 11).

Los organismos permanecieron 24 horas en las unidades experimentales antes de ser retados por vía intramuscular contra WSSV.

Los tratamientos y el control positivo fueron infectados mediante una inyección entre el tercer y cuarto segmento abdominal con 100 DI de WSSV diluidas en 50  $\mu$ l de Buffer PBS 2X.

Durante el bioensayo, los organismos fueron mantenidos en agua de mar a 30 UPS y  $28 \pm 1.0$  °C de temperatura, con recambio de agua de 90% cada tercer día.

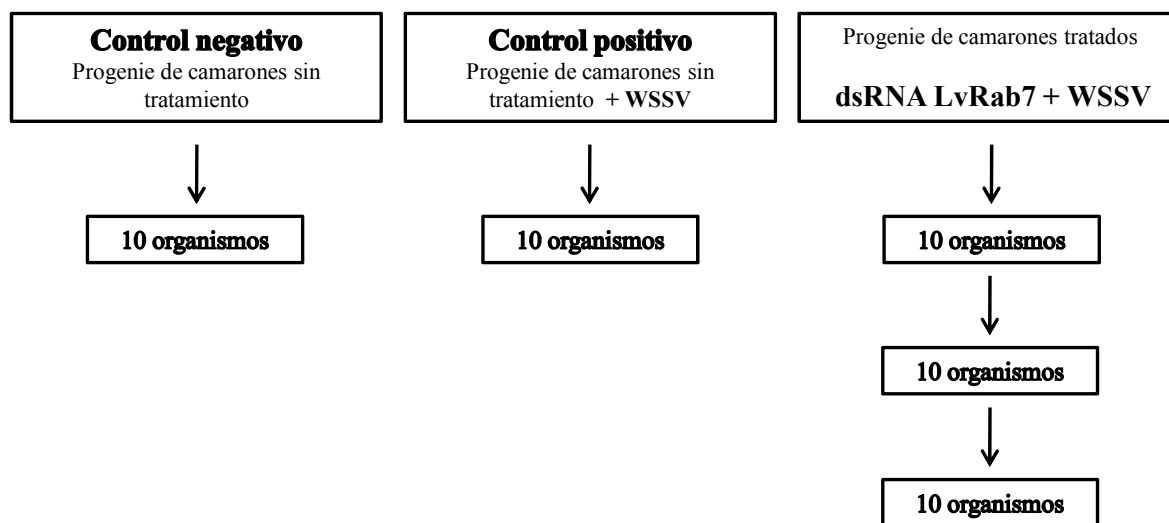


Figura 11.- Diseño de los bioensayos de reto contra WSSV en la progenie de camarones tratados con dsRNA-LvRab7. Los controles, positivo y negativo fueron camarones provenientes de reproductores sin tratamiento.

### **Infección por ruta oral (per os) en la progenie**

Al mismo tiempo, se realizó un experimento idéntico donde se suministró el virus a los organismos por ruta oral, alimentando a los camarones con tejido muscular de camarones infectados.

Para obtener el tejido infectado con WSSV, se infectó con una dosis alta (2500 DI) de virus a un grupo de camarones. Estos organismos permanecieron en observación durante cinco días. Durante este tiempo, los camarones moribundos o con signos claros de la enfermedad fueron colectados. Inmediatamente después, se les extrajo el hepatopáncreas y se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  para ser utilizados como alimento. Una vez colectados todos los camarones infectados, fueron macerados y mezclados hasta formar una pasta. El tejido macerado fue congelado nuevamente a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Antes de suministrar el alimento infectado, los camarones permanecieron sin alimento 24 horas. El tejido infectado fue suministrado en una proporción del 10% de la biomasa total de los camarones experimentales en una ración diaria por dos días. El tiempo cero post infección fue cuando se suministró la primera ración de tejido infectado. Durante el experimento, se recambió 90% del agua diariamente durante los primeros tres días y

posteriormente cada tercer día. Los animales fueron mantenidos en agua de mar a 30 UPS y temperatura de  $28 \pm 1.0$  °C.

### **Caracterización del silenciamiento de LvRab7 en diferentes tejidos de camarón**

Para determinar el tiempo que perdura el silenciamiento de LvRab7 en camarones, se realizó un experimento de silenciamiento con 4µg de dsRNA-LvRab7. Se tomaron muestras de pleópodos, branquias y hemolinfa a 2, 7, 14 y 21 días post tratamiento. Al final del experimento, las muestras fueron analizadas mediante RT-PCR cuantitativo como se indicó anteriormente en la metodología.

### **Camarones experimentales**

Se obtuvieron 200 camarones juveniles de  $15 \pm 2.5$  g de los estanques del CIBNOR-La Paz y fueron colocados en un tanque con aproximadamente 1,500 L de agua de mar filtrada con aireación constante en el laboratorio para cultivo de crustáceos del CIBNOR.

### **Diseño experimental para evaluar el silenciamiento de LvRab7 en diferentes tejidos de camarón**

Se trataron 60 camarones con dsRNA-LvRab7 y se colocaron en seis tinas con 80 L de agua de mar filtrada y aireación constante. Se mantuvieron a  $27 \pm 1.0$  °C con calentadores automáticos, se les recambió 50% del agua diariamente y fueron alimentados con alimento comercial. Los camarones sin tratamiento permanecieron en el tanque de mantenimiento y fueron usados como control negativo.

Se colectaron nueve camarones tratados y nueve sin tratamiento a los 2, 7, 14 y 21 dpt. A cada camarón se le extrajo hemolinfa, se colectaron pleópodos y branquias. Las muestras de hemolinfa fueron colocadas en hielo durante el proceso de toma de muestra (30 minutos) y posteriormente procesadas y fijadas con Trizol. Las muestras de pleópodos y branquias se fijaron in situ con trizol y se mantuvieron en hielo hasta llegar al laboratorio (30 minutos).

Una vez fijadas, las muestras fueron maceradas y congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

Al final del experimento, se extrajo RNA de todas las muestras, se sintetizaron los cDNAs y se analizaron mediante RT-PCR cuantitativo como se indicó anteriormente.

## Resultados

### Detección, clonación y secuenciación del gen Rab7 en *Litopenaeus vannamei*

Se amplificaron mediante RT-PCR tres fragmentos del ORF LvRab7. Los tamaños fueron de 618, 494 y 399 pb con los oligonucleótidos LvRab7-F1/R1, F2/R1 y F1/R2 respectivamente.

Los tres fragmentos fueron amplificados en muestras de hemolinfa, branquias y músculo de reproductores sanos de *L. vannamei*. El fragmento de 618 pb correspondiente al ORF completo en los tres tejidos fue clonado y secuenciado por la compañía GNEWIS (USA).

El análisis de secuencia mediante BLAST indicó un 96% de homología con Rab7 de *P. monodon*, 94% con *M. japonicus* y 99% con *L. vannamei* de Tailandia. Solamente un nucleótido fue diferente de la secuencia de Tailandia con la de México (Figura 12).

PmRab7	ATGGCATCTCGCAAGAAGATTCTCCTGAAGGTGATCATCCTGGAGACTCTGGGTAGGCCAAAACATCCCTTATGAACCAGTTTGTAAACAAGAAATTCA	100
MjRab7	ATGGCATCAGCAAGAAGATTCTCCTGAAGGTGATCATCCTGGAGACTCTGGGTAGGCCAAAACATCCCTTATGAACCAGTTTGTAAACAAGAAATTCA	100
LvRab7 Tai	ATGGCATCTCGCAAGAAGATTCTCCTGAAGGTGATCATCCTGGAGACTCAGGTGTAGGCCAAAACATCCCTTATGAACCAGTTTGTAAACAAGAAATTCA	100
LvRab7 Mex	ATGGCATCTCGCAAGAAGATTCTCCTGAAGGTGATCATCCTGGAGACTCAGGTGTAGGCCAAAACATCCCTTATGAACCAGTTTGTAAACAAGAAATTCA	100
PmRab7	GCAACCAATACAAGGCAACCATTGGGCAGACTTCCTCACAAGGAGGTATGGTTGATGACAGATTGGTCAACATGCAGATCTGGGATACAGCTGGTCA	200
MjRab7	GCAACCAATACAAGGCAACCATTGGGCAGACTTCCTCACAAGGAGGTATGGTTGATGACAGATTGGTCAACATGCAGATCTGGGATACAGCTGGTCA	200
LvRab7 Tai	GCAACCAATACAAGGCAACCATTGGGCAGACTTCCTCACAAGGAGGTATGGTTGATGACAGATTGGTCAACATGCAGATCTGGGATACAGCTGGTCA	200
LvRab7 Mex	GCAACCAATACAAGGCAACCATTGGGCAGACTTCCTCACAAGGAGGTATGGTTGATGACAGATTGGTCAACATGCAGATCTGGGATACAGCTGGTCA	200
PmRab7	AGAGAGATTCAGTCTTTAGGTGTTGCATTCATCGAGGAGCTGATGTTGTGTCTGTCTATGATGTTACATCTCCCAAACACCTTCAAGTCTCTTGAT	300
MjRab7	AGAGAGATTCAGTCTTTAGGTGTTGCATTCATCGAGGAGCTGATGTTGTGTCTGTCTATGATGTTACATCTCCCAAACACCTTCAAGTCTCTTGAT	300
LvRab7 Tai	AGAAAGATTCAGTCTTTAGGTGTTGCATTCATCGAGGAGCTGATGTTGTGTCTGTCTATGATGTTACATCTCCCAAACACCTTCAAGTCTCTTGAT	300
LvRab7 Mex	AGAAAGATTCAGTCTTTAGGTGTTGCATTCATCGAGGAGCTGATGTTGTGTCTGTCTATGATGTTACATCTCCCAAACACCTTCAAGTCTCTTGAT	300
PmRab7	TCATGGCGTGACGAGTTTCTAATCAAGCCTCACAAGGAGCCCTGACACTTCCCATTTGTTGCTCTGGGTAACAAGATTGATCTGGAGAATAGGGCGG	400
MjRab7	TCATGGCGTGACGAGTTTCTAATCAAGCCTCACAAGGAGCCCTGACACTTCCCATTTGTTGCTCTGGGTAACAAGATTGATCTGGAGAATAGGGCGG	400
LvRab7 Tai	TCATGGCGTGACGAGTTTCTAATCAAGCCTCACAAGGAGCCCTGACACTTCCCATTTGTTGCTCTGGGTAACAAGATTGATCTGGAGAATAGGGCGG	400
LvRab7 Mex	TCATGGCGTGACGAGTTTCTAATCAAGCCTCACAAGGAGCCCTGACACTTCCCATTTGTTGCTCTGGGTAACAAGATTGATCTGGAGAATAGGGCGG	400
PmRab7	TATCAGCAAGCGAGCACAACAATGGTGTATAGTAAAAATGAAGTTCCCTACTTTGAAACTAGTGCAAAGGAAGCCATTAAATGTGGAGTAGCCTTTCCA	500
MjRab7	TATCAGCAAGCGAGCACAACAATGGTGTATAGTAAAAATGAAGTTCCCTACTTTGAAACTAGTGCAAAGGAAGCCATTAAATGTGGAGTAGCCTTTCCA	500
LvRab7 Tai	TATCAGCAAGCGAGCACAACAATGGTGTATAGTAAAAATGAAGTTCCCTACTTTGAAACTAGTGCAAAGGAAGCCATTAAATGTGGAGTAGCCTTTCCA	500
LvRab7 Mex	TATCAGCAAGCGAGCACAACAATGGTGTATAGTAAAAATGAAGTTCCCTACTTTGAAACTAGTGCAAAGGAAGCCATTAAATGTGGAGTAGCCTTTCCA	500
PmRab7	GACCATTGCTCGCAATGCTCTTGCTCAGGAGTCTGAGGTGGAACTCTACAATGAGTTTCCAGACCAGATCAAATTGACCAATGACAACAAGGCTAAACAG	600
MjRab7	GACCATTGCTCGCAATGCTCTTGCTCAGGAGTCTGAGGTGGAACTCTACAATGAGTTTCCAGACCAGATCAAATTGACCAATGACAACAAGGCTAAACAG	600
LvRab7 Tai	GACCATTGCTCGCAATGCTCTTGCTCAGGAGTCTGAGGTGGAACTCTACAATGAGTTTCCAGACCAGATCAAATTGACCAATGACAACAAGGCTAAACAG	600
LvRab7 Mex	GACCATTGCTCGCAATGCTCTTGCTCAGGAGTCTGAGGTGGAACTCTACAATGAGTTTCCAGACCAGATCAAATTGACCAATGACAACAAGGCTAAACAG	600
PmRab7	GATGCAATGCTCTTGCTAA	618
MjRab7	GATGCAATGCTCTTGCTAA	618
LvRab7 Tai	GATGCAATGCTCTTGCTAA	618
LvRab7 Mex	GATGCAATGCTCTTGCTAA	618

Figura 12.- Alineamiento y comparación entre las secuencias de Rab7 aisladas de *Penaeus monodon* (PmRab7), *Marsupenaeus japonicus* (MjRab7), *Litopenaeus vannamei* Tailandia (LvRab7) y *L. vannamei* México (LvRab7 Mex). Las diferencias están señaladas por colores. Una diferencia (gris claro), dos diferencias (gris oscuro) y diferencias entre los dos aislados en *L. vannamei* (negro).



El análisis de secuencia con BLAST-X al traducir la secuencia de nucleótidos a aminoácidos, indicó que Rab7 aislada en camarones reproductores (*L. vannamei*) de Sinaloa, es idéntica a Rab7 de *P. monodon* (Genbank Acceso DG231062), *M. japonicus* (Genbank Acceso BAG06944) y *L. vannamei* de Tailandia (Genbank Acceso ACT65737). Además, presenta una marcada homología con especies de diferentes taxa como pez cebra [(*Danio rerio*) GenBank Acceso NP\_957222], gallo [(*Gallus gallus*) GenBank Acceso XP\_414359], ratón [(*Mus musculus*) GenBank Acceso CAA61797] y mosquito [(*Aedes aegypti*) GenBank Acceso XP\_001663804] (Figura 13).

El análisis de BLAST-X mostró que LvRab7 contiene cinco sitios de unión a GTP conocidos como regiones de GTPasas y dos residuos de cisteína en la región amino terminal que pueden ser isoprenilados, es decir, que en esta región se pueden unir moléculas hidrofóbicas que putativamente facilitarían su unión a la membrana celular (Sritunyalucksana et al., 2006).

PmRab7	MASRKKILLKVIILGDSGVGKTSLMNQFVNKKFSNQYKATIGADELTKEVMVDDRLVTMQIWDTAGQERFQSLGVAFYRGADCCVLYVDVTSPTPKSLD	100
MjRab7	MASRKKILLKVIILGDSGVGKASLMNQFVNKKFSNQYKATIGADELTKEVMVDDRLVTMQIWDTAGQERFQSLGVAFYRGADCCVLYVDVTSPTPKSLD	100
LvRab7	MASRKKILLKVIILGDSGVGKTSLMNQFVNKKFSNQYKATIGADELTKEVMVDDRLVTMQIWDTAGQERFQSLGVAFYRGADCCVLYVDVTSPTPKSLD	100
LvRab7 Mex	MASRKKILLKVIILGDSGVGKTSLMNQFVNKKFSNQYKATIGADELTKEVMVDDRLVTMQIWDTAGQERFQSLGVAFYRGADCCVLYVDVTSPTPKSLD	100
Mosquito-Rab7	MATRKKVLLKVIILGDSGVGKTSLMNQYVTKRFSNQYKATIGADELTKEVVIDRVVTMQIWDTAGQERFQSLGVAFYRGADCCVLYVDVTSPTPKSLD	100
Pez cebra-Rab7	MTSRKKVLLKVIILGDSGVGKTSLMNQYVNKKFSNQYKATIGADELTKEVMVDDRLVTMQIWDTAGQERFQSLGVAFYRGADCCVLYVDVTSPTPKSLD	100
Gallo-Rab7	MTSRKKVLLKVIILGDSGVGKTSLMNQYVNKKFSNQYKATIGADELTKEVMVDDRLVTMQIWDTAGQERFQSLGVAFYRGADCCVLYVDVTSPTPKSLD	100
Ratón-Rab7	MTSRKKVLLKVIILGDSGVGKTSLMNQYVNKKFSNQYKATIGADELTKEVMVDDRLVTMQIWDTAGQERFQSLGVAFYRGADCCVLYVDVTSPTPKSLD	100
	1 2 3	
PmRab7	SWRDEFLIQASPRDPDHPFVVLGNKIDLENRAVSTKRAQQWCHSKNEVPYFETSAKEAINVELAFQTIARNALAQESEVELYNEFPDQIKLTNDNKAKQ	200
MjRab7	SWRDEFLIQASPRDPDHPFVVLGNKIDLENRAVSTKRAQQWCHSKNEVPYFETSAKEAINVELAFQTIARNALAQESEVELYNEFPDQIKLTNDNKAKQ	200
LvRab7	SWRDEFLIQASPRDPDHPFVVLGNKIDLENRAVSTKRAQQWCHSKNEVPYFETSAKEAINVELAFQTIARNALAQESEVELYNEFPDQIKLTNDNKAKQ	200
LvRab7 Mex	SWRDEFLIQASPRDPDHPFVVLGNKIDLENRAVSTKRAQQWCHSKNEVPYFETSAKEAINVELAFQTIARNALAQESEVELYNEFPDQIKLTNDNKAKQ	200
Mosquito-Rab7	SWRDEFLIQASPRDPDHPFVVLGNKIDLENRAVSTKRAQQWCAQNDIPYFETSAKEGINVDLAFQTIARNALAQESEVELYNEFPDQIKLNADRNRNP	200
Pez cebra-Rab7	SWRDEFLIQASPRDPENFPFVVLGNKIDLENRQVTTKRAQAWCQKNPIPYFETSAKEAINVEQAFQTIARNALKQETEVLYNEFPPEPIKLDNRDRAPK	200
Gallo-Rab7	SWRDEFLIQASPRDPENFPFVVLGNKIDLENRQVTTKRAQAWCQKNPIPYFETSAKEAINVEQAFQTIARNALKQETEVLYNEFPPEPIKLDNRDRVKA	200
Ratón-Rab7	SWRDEFLIQASPRDPENFPFVVLGNKIDLENRQVATKRAQAWCYRKNPIPYFETSAKEAINVEQAFQTIARNALKQETEVLYNEFPPEPIKLDNRDRAKA	200
	4 5	
PmRab7	---DA <b>CSC</b>	205
MjRab7	---DA <b>CSC</b>	205
LvRab7	---DA <b>CSC</b>	205
LvRab7 Mex	---DA <b>CSC</b>	205
Mosquito-Rab7	RNGDM <b>CSC</b>	208
Pez cebra-Rab7	-SAET <b>CSC</b>	207
Gallo-Rab7	-SAE <b>CSC</b>	207
Ratón-Rab7	-SAE <b>CSC</b>	207

Figura 13. Comparación de la secuencia de aminoácidos de LvRab7 de México con la secuencia de Rab7 en otras especies de camarón y con organismos de otros taxa. Las coincidencias en las secuencias están representadas por una línea continua arriba de las secuencias. Se introdujeron guiones en algunos espacios para alinear mejor las secuencias. Los cinco sitios conservados, característicos de las GTPasas están marcados en cajas grises y los residuos de cisteína en cajas negras.

### Titulación del inóculo de WSSV

Como se mencionó en metodología, se prepararon seis diluciones seriales ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ ) con PBS 1X y se inyectaron cinco camarones por dilución con 100  $\mu$ l de cada una.

Las mortalidades en las primeras cuatro diluciones alcanzaron el 100%. En la dilución  $10^{-5}$  la mortalidad llegó a 60% y en  $10^{-6}$  0%. El análisis de PCR realizado a los camarones muertos confirmó la presencia de WSSV. En contraste, no se logró detectar WSSV en los camarones sobrevivientes de las diluciones  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ . El total de muertos se refiere a los muertos de la dilución, mas todos los muertos de las siguientes diluciones (las más diluidas) y de manera inversa el total de supervivientes se refiere a el número de camarones que no se murió en la dilución mas todos los camarones que no se murieron en las diluciones anteriores (las menos diluidas).

Los resultados de mortalidad se presentan en la Tabla V.

Tabla V. Resultados de mortalidad y supervivencia de cinco camarones por dilución, inyectados con 100  $\mu$ l de cada dilución del inóculo original.

Log negativo de la dilución	muertos	supervivientes	Total muertos	Total supervivientes	Total de totales	Relación muertos/Total de totales	Mortalidad (%)
$10^{-1}$	5	0	23	0	23	1	100
$10^{-2}$	5	0	18	0	18	1	100
$10^{-3}$	5	0	13	0	13	1	100
$10^{-4}$	5	0	8	0	8	1	100
$10^{-5}$	3	2	3	2	5	0.6	60
$10^{-6}$	0	5	0	7	7	0	0

Se aplicaron los resultados obtenidos a la fórmula:

$$\frac{A - B}{A - C} = D$$

Donde:

A = % de infectados en la dilución más alta que mató a más de 50%

B = 50% de mortalidad

C = % de infectados en la dilución que mató a menos de 50%

D = Fracción faltante a la primera dilución que mató a más de 50%

Se obtuvo: 
$$\frac{60 - 50}{60 - 0} = 0.16$$

En esta operación, el factor se supone como Negativo, por lo tanto, el Log negativo de la  $DL_{50}$  es igual al Log Negativo de la mayor dilución que infectó y mató a más del 50% de animales (en este caso  $10^{-5} = 60\%$ ) mas la distancia proporcional para alcanzar el 50% (en este caso 0.16). Finalmente se multiplica por el logaritmo negativo del factor de dilución (en este caso -1).

De aquí, se definió que el inóculo diluido  $10^{-5}$  infectó y mató al 60% de los animales tratados y por lo tanto hubo que diluirlo un poco más. En este caso  $10^{-0.16}$  veces.

Por lo tanto la dilución que infectó al 50% de los camarones inoculados en este estudio fue  $10^{-5.16(-1)} = 10^{5.16}$ .

De acuerdo al concepto de “Dosis Infecciosa” que se define como la cantidad de virus que aplicada individualmente a un grupo de organismos, infecta al 50 % de ellos. Por lo tanto, se concluyó que 100  $\mu$ l de una dilución  $10^{-5.16}$  inyectados a cada camarón, infecta 50% de los organismos inyectados. Y dado que el título viral se expresa por ml, un mililitro de esa dilución contiene diez DI.

Finalmente, en este caso, el título en DI/ml fue  $10 \times 10^{5.16} = 10^{6.16}$  y al redondear los decimales obtuvimos  $10^{6.2} = 1,584,893$  DI/ml

### **Efecto antiviral inducido por la inyección de 4 $\mu$ g de dsRNA con una secuencia parcial o la secuencia completa del ORF-LvRab7**

El dsRNA fue suministrado a los camarones experimentales por vía intramuscular 48 horas antes de la infección y el seguimiento fue por 240 horas posteriores a la infección.

Los controles positivos (sin tratamiento) que fueron retados contra 2500 DI de WSSV alcanzaron 100% de mortalidad a las 72 horas post infección (hpi) con un tiempo de letalidad del 50 % a las 33 horas ( $TL_{50} = 33$  h). A este tiempo, los camarones tratados con la secuencia parcial de dsRNA alcanzaron 22% y los tratados con la secuencia completa 28 %. Al final del experimento (240 hpi), la mortalidad acumulada de los camarones tratados con la secuencia parcial de dsRNA alcanzaron 80 % y los tratados con la secuencia completa 88% (Figura 14). Los tiempos de letalidad del 50% fueron 160 h y 136 h respectivamente. De acuerdo al análisis “probit” no hubo diferencias significativas al tratar a los camarones con la secuencia completa o parcial de dsRNA-LvRab7 con respecto a la mortalidad.

De acuerdo a los resultados de PCR, todos los camarones que murieron durante el experimento fueron positivos para WSSV. En contraste, no se logró detectar WSSV en los organismos sobrevivientes por PCR y RT-PCR.

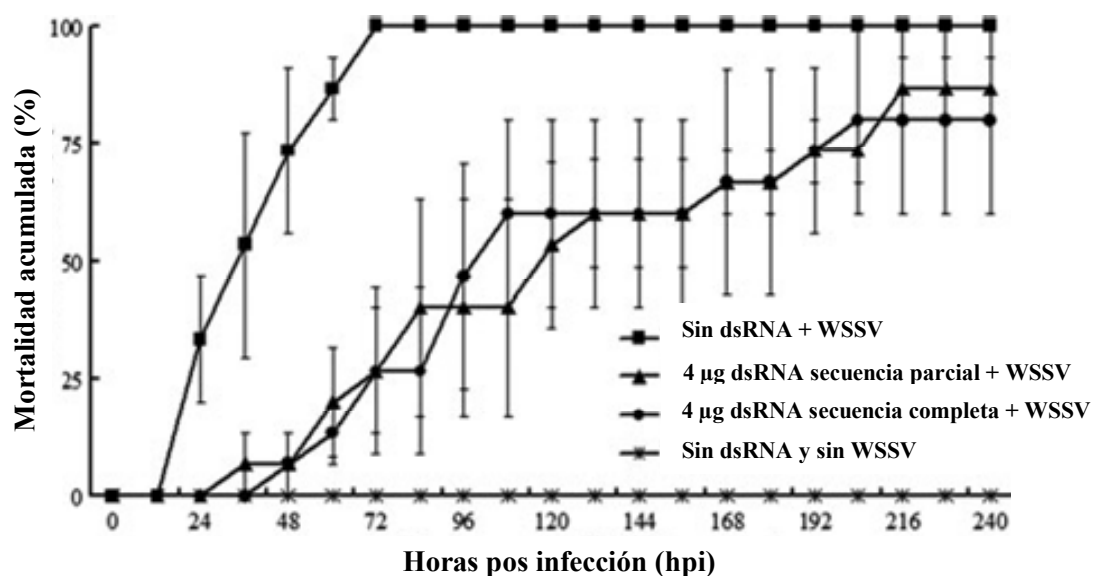


Figura 14. Mortalidad acumulada de reproductores de *Litopenaeus vannamei* tratados con 4 µg de una secuencia parcial (494 pb) o total (618 pb) de dsRNA-LvRab7 y retados contra WSSV (2500 DI).

### Efecto antiviral en reproductores de *L. vannamei* tratados con 4 o 20 $\mu\text{g}$ de dsRNA-LvRab7 y retos contra 25 o 2500 DI de WSSV

Se realizó un experimento con reproductores de *L. vannamei* aplicando 4 o 20  $\mu\text{g}$  de dsRNA-LvRab7 por camarón.

Después de 48 horas los animales fueron inyectados con una dosis alta de WSSV (2500 DI). Los controles positivos (sin dsRNA) tuvieron 100% de mortalidad a las 72 hpi con un tiempo de letalidad del 50% a las 53 h. En este tiempo los camarones tratados con 4 o 20  $\mu\text{g}$  de dsRNA-LvRab7 tuvieron mortalidades de 27% y 40% respectivamente. Al final del experimento (240 hpi) ambos tratamientos alcanzaron 80% de mortalidad (Figura 15).

El  $TL_{50}$  para el tratamiento con 4  $\mu\text{g}$  de dsRNA fue de 135 h y 120 h para el tratamiento con 20  $\mu\text{g}$ . De acuerdo al análisis “probit” no hubo diferencias significativas al tratar a los camarones con 4 o 20  $\mu\text{g}$  de dsRNA-LvRab7 con respecto a la mortalidad.

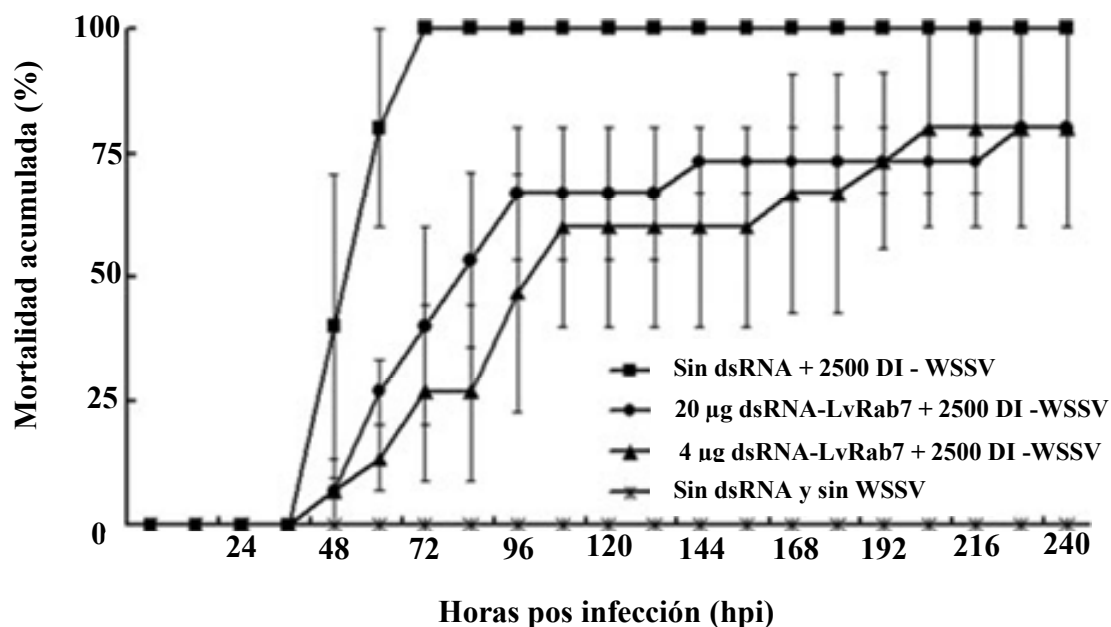


Figura 15. Mortalidad acumulada de reproductores de *Litopenaeus vannamei* tratados con 4 o 20  $\mu\text{g}$  de dsRNA-LvRab7 y retos contra una dosis alta de WSSV (2500 DI).

Se realizó otro experimento con los mismos tratamientos pero los camarones fueron infectados con una dosis 100 veces más baja de WSSV (25 DI).

Los camarones usados como controles positivos alcanzaron 100% de mortalidad a las 120 hpi, con un  $TL_{50}$  a las 53 h. En este tiempo los animales tratados con 4 o 20  $\mu$ g de dsRNA-LvRab7 tuvieron mortalidades de 13% y 33% respectivamente. Al final del experimento (diez dpi) los tratamientos alcanzaron 33% y 40% de mortalidad respectivamente (Figura 16). El  $TL_{50}$  para el tratamiento con 4  $\mu$ g de dsRNA fue de 333 h y 211 h para el tratamiento con 20  $\mu$ g. De acuerdo al análisis “probit” no hubo diferencias significativas al tratar a los camarones con 4 o 20  $\mu$ g de dsRNA-LvRab7 con respecto a la mortalidad.

De acuerdo a los resultados de PCR, todos los camarones que murieron durante los dos experimentos fueron positivos para WSSV y los sobrevivientes fueron negativos en los análisis de PCR y RT-PCR.

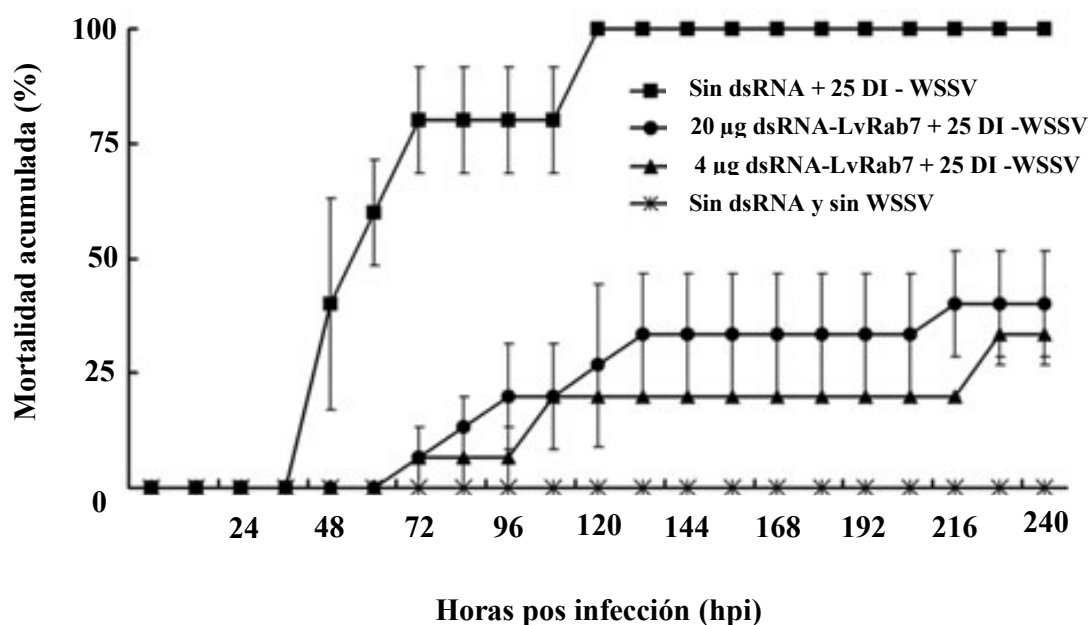


Figura 16. Mortalidad acumulada de reproductores de *Litopenaeus vannamei* tratados con 4 o 20  $\mu$ g de dsRNA-LvRab7 y retados contra una dosis baja de WSSV (25 DI).

### Expresión de LvRab7 en reproductores tratados con 4 o 20 $\mu\text{g}$ de dsRNA

Los análisis de RT-PCR de animales tratados con dsRNA mostraron una disminución notable de la expresión de LvRab7 hasta las 120 hpt. Los niveles de  $\beta$ -actina en los mismos camarones antes y después del tratamiento indicaron que el dsRNA-LvRab7 no afectó su expresión (Figura 17).

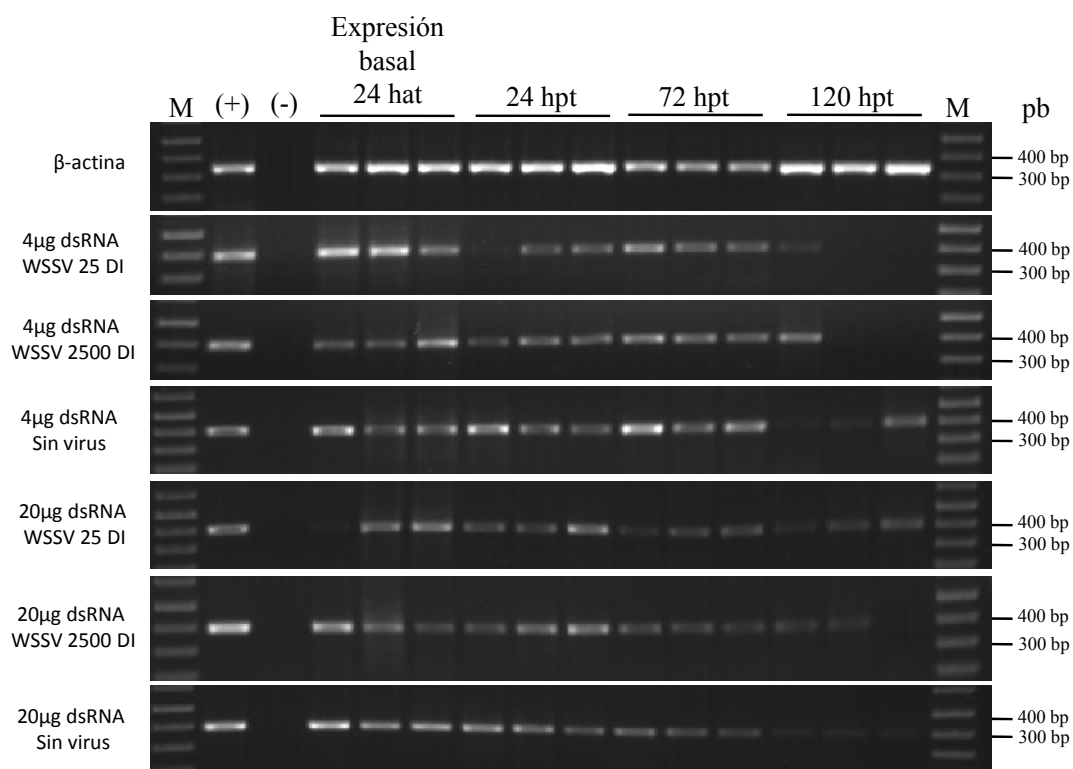


Figura 17. Expresión de LvRab7 en hemolinfa de reproductores (*L. vannamei*) tratados con 4 o 20  $\mu\text{g}$  de dsRNA-LvRab7. La expresión corresponde a muestras tomadas de tres organismos a las 24, 72 y 120 horas post tratamiento (hpt). El nivel basal de expresión se obtuvo en muestras colectadas 24 horas antes del tratamiento [(hat) basal]. La expresión de  $\beta$ -actina fue usada como control interno.

### Duración del efecto contra WSSV inducido por el silenciamiento de LvRab7 en reproductores de *Litopenaeus vannamei*

En el presente estudio, se determinó la eficiencia y duración del efecto contra WSSV en camarones tratados con dsRNA-LvRab7 mediante tres experimentos de reto contra 20 DI de WSSV; a los 7, 14 y 21 días post tratamiento (dpt).

En el experimento de reto a 7dpt se observó una mortalidad drástica en los controles positivos la cual alcanzó el 100% a los cuatro dpi. El valor  $LT_{50}$  fue de 75 hrs en los controles de todos los experimentos. En contraste, los camarones tratados con dsRNA-LvRab7 no presentaron signos de enfermedad ni hubo mortalidad durante los diez días del experimento. (Figura 18). Los análisis de PCR y RT-PCR confirmaron la presencia de WSSV en los controles positivos y la ausencia de infección en los animales tratados con dsRNA.

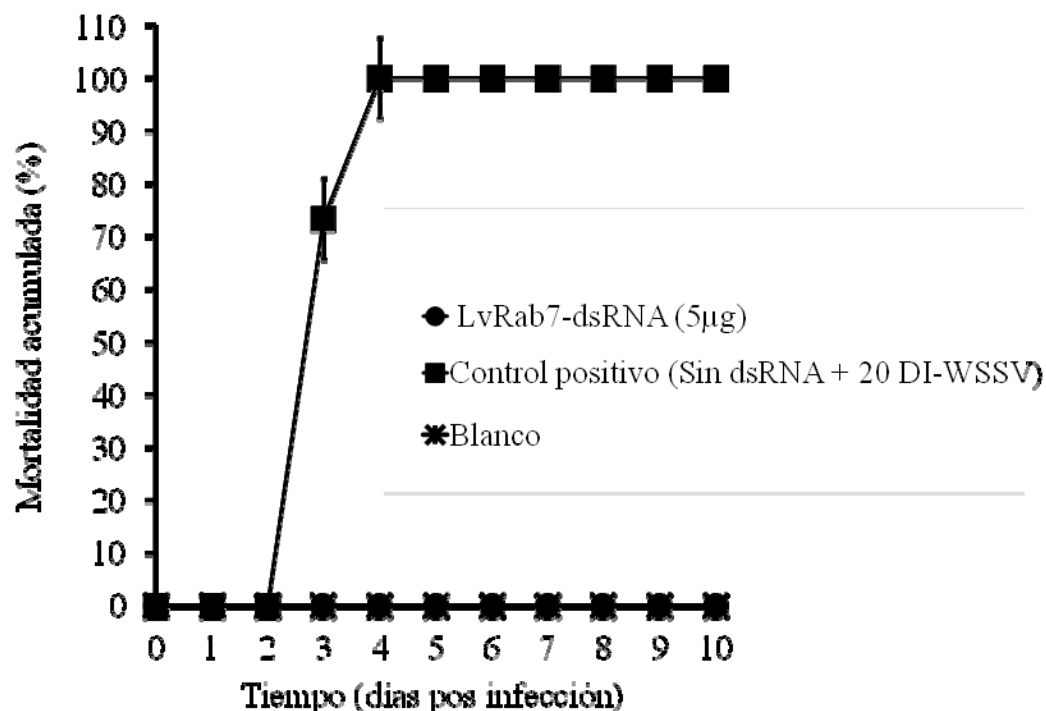


Figura 18. Mortalidad acumulada de reproductores de *Litopenaeus vannamei* tratados con 5 µg de dsRNA-LvRab7 y retados contra una dosis baja de WSSV (20 DI) a los siete días post tratamiento.



En el segundo experimento de reto (camarones con 14 dpt) los controles positivos alcanzaron el 100% de mortalidad a los cuatro dpi. A este tiempo, la mortalidad en los camarones tratados con dsRNA-LvRab7 alcanzó 13%, y llegó hasta 40% al final del experimento (diez dpi) con una  $TL_{50}$  de 229 hrs (Figura 19).

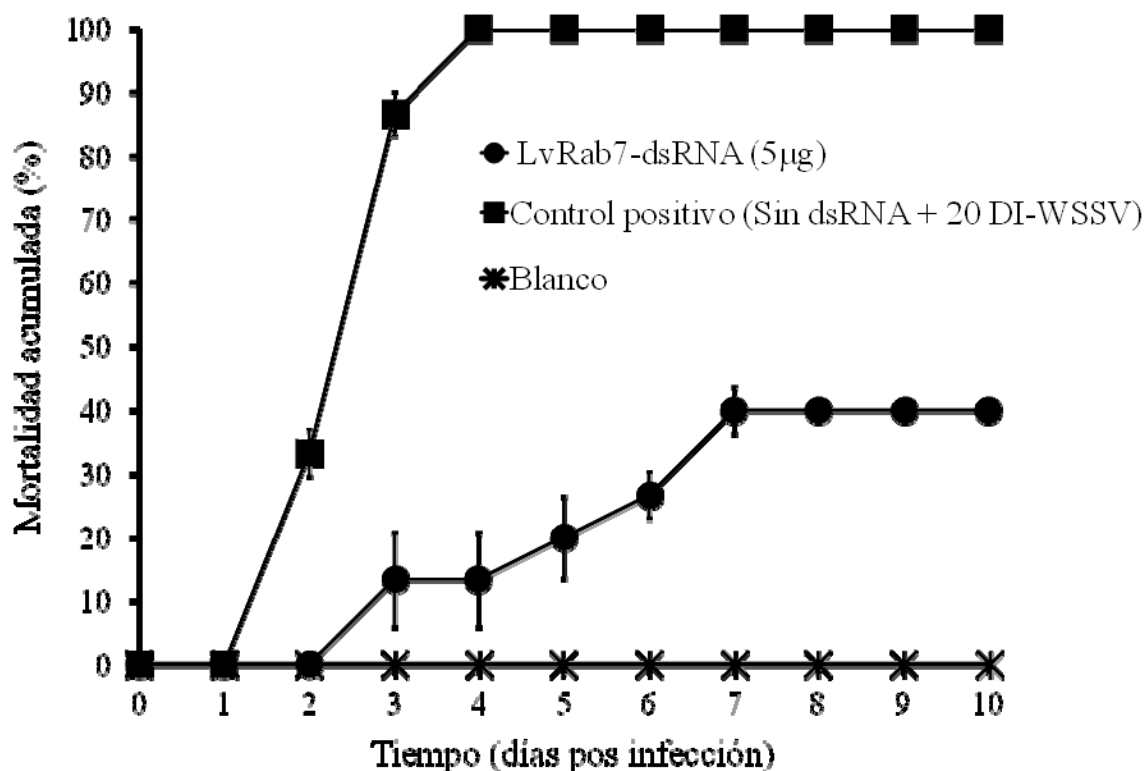


Figura 19. Mortalidad acumulada de reproductores de *Litopenaeus vannamei* tratados con 5 µg de dsRNA-LvRab7 y retados contra una dosis baja de WSSV (20 DI) a los 14 días post tratamiento.

En el tercer experimento de reto (21 días dpt), la mortalidad inicio en los camarones del tratamiento con 13 % en el día uno post infección. A este tiempo no había mortalidad en los controles positivos. Al finalizar el experimento (diez dpi) la mortalidad en los camarones tratados con dsRNA-LvRab7 alcanzó 27% con una  $TL_{50}$  de 364 hrs (20).

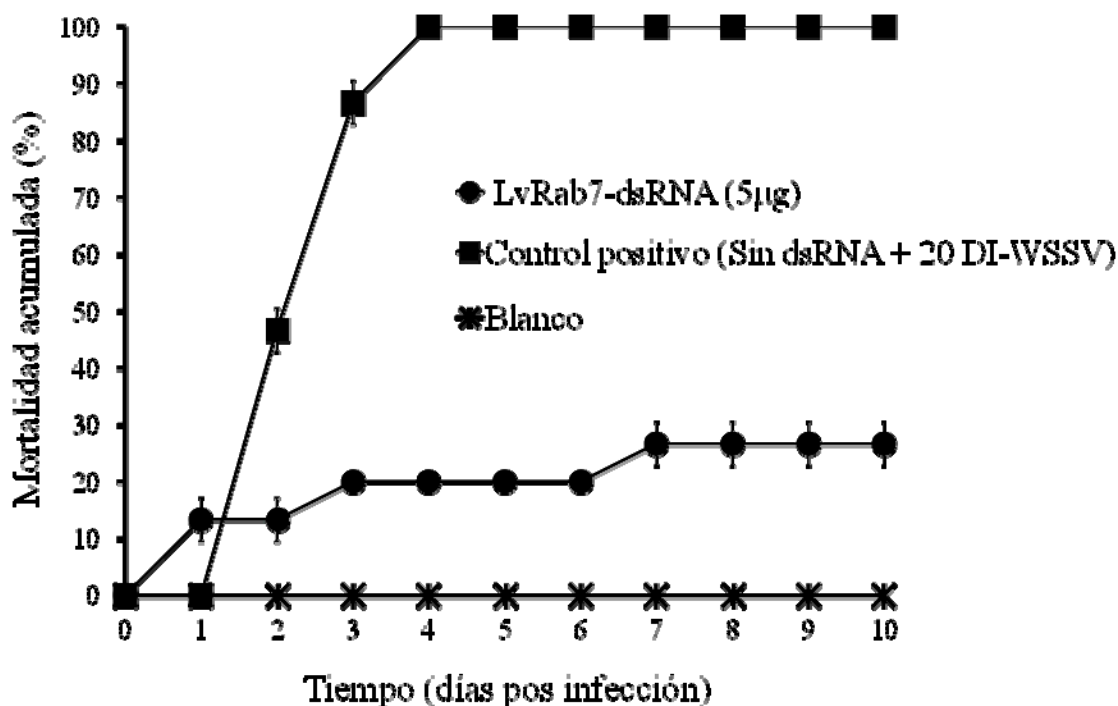


Figura 20. Mortalidad acumulada de reproductores de *Litopenaeus vannamei* tratados con 5 µg de dsRNA-LvRab7 y retados contra una dosis baja de WSSV (20 DI) a los 2 días post tratamiento.

La infección de WSSV en los controles fue confirmada por análisis de PCR y RT-PCR. Sorpresivamente, todos los animales tratados con dsRNA (supervivientes y muertos) fueron negativos para WSSV de acuerdo a los análisis de PCR y RT-PCR.

Cabe mencionar que al iniciar el reto a los 21 dpt se observó que los camarones tratados con dsRNA-LvRab7 aparentaban haber perdido masa muscular y el exoesqueleto crepitaba al tomarlos con la mano. En contraste, los camarones sin tratamiento no presentaron estas características.

Al final de los experimentos, el análisis “probit” indicó diferencias significativas en los valores de  $LT_{50}$  entre los tratamientos y entre cada uno de estos y los controles positivos.

### **Expresión de LvRab7 y WSSV mediante RT-PCR en los camarones tratados con dsRNA-LvRab7 e infectados después de 7, 14 y 21 días post tratamiento**

Se evaluó mediante RT-PCR la expresión de LvRab7 y WSSV en todos los camarones experimentales. En la figura 22 se muestran los resultados organizados en cuatro grupos de acuerdo a sus particularidades específicas: 1) blanco, 2) control positivo, 3) muertos durante el experimento y 4) sobrevivientes a la infección.

La expresión de LvRab7 presentó claramente niveles detectables en los camarones del tratamiento blanco y en los controles positivos (sin dsRNA). Los camarones sobrevivientes mostraron una expresión menor pero detectable. En contraste, los camarones muertos durante los experimentos mostraron niveles no detectables de LvRab7 (Figura 21).

Los niveles de  $\beta$ -actina en todas las muestras fueron muy similares, esto indicó que su expresión no fue afectada por el dsRNA ni por el virus.

Por otra parte, la expresión de VP28-WSSV se detectó en los controles positivos por lo que quedó de manifiesto la infectividad del inóculo. En contraste, WSSV no fue detectado en los camarones sobrevivientes de los tres experimentos con lo que se evidenció la duración del efecto antiviral inducido por la inyección de dsRNA-LvRab7. Sorpresivamente, no se detectó WSSV en los camarones muertos durante los ensayos de reto.

La integridad de los RNAs fue similar en todas las muestras analizadas como se visualizó en un gel de agarosa al 1% (Figura 21).

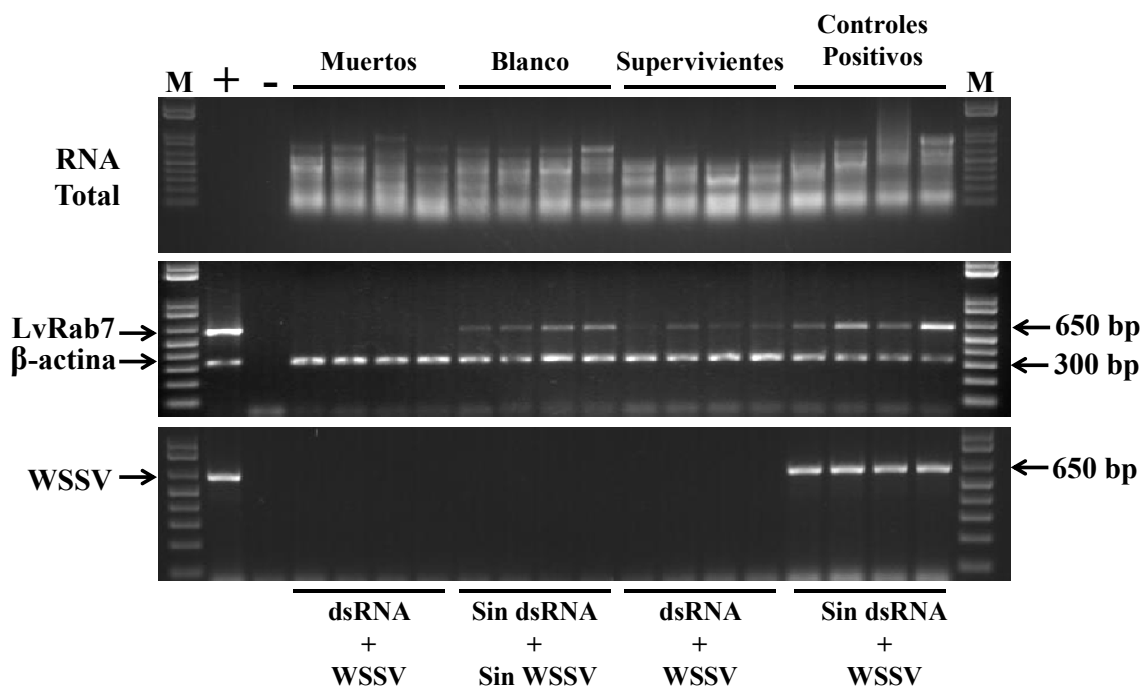


Figura 21. Expresión de LvRab7,  $\beta$ -actina y WSSV-VP28 en tejido branquial de reproductores de *L. vannamei*. El RNA total correspondiente a las muestras se visualiza en la parte superior. Los niveles de LvRab7 y  $\beta$ -actina se muestran en el medio. La expresión de WSSV-VP28 se muestra en la parte inferior de la imagen. Muertos (camarones tratados con dsRNA que murieron durante los experimentos), Blanco (camarones sin tratamiento y sin virus), Supervivientes (camarones tratados que sobrevivieron a la infección) y Controles positivos (camarones sin tratamiento e inoculados con WSSV).

### Expresión de LvRab7 mediante RT-PCR cuantitativo

Para verificar la expresión de LvRab7 en los camarones experimentales se analizaron mediante RT-PCR en tiempo real seis grupos representativos (Figura 22).

La expresión de LvRab7 en los camarones blanco y en los controles positivos fue estadísticamente semejante, por lo que WSSV no interfiere con su expresión.

La menor expresión de LvRab7 se encontró en los camarones muertos durante los experimentos.

La comparación de expresiones relativas mediante un análisis de varianza (ANOVA) mostró diferencias significativas entre los camarones tratados y no tratados.

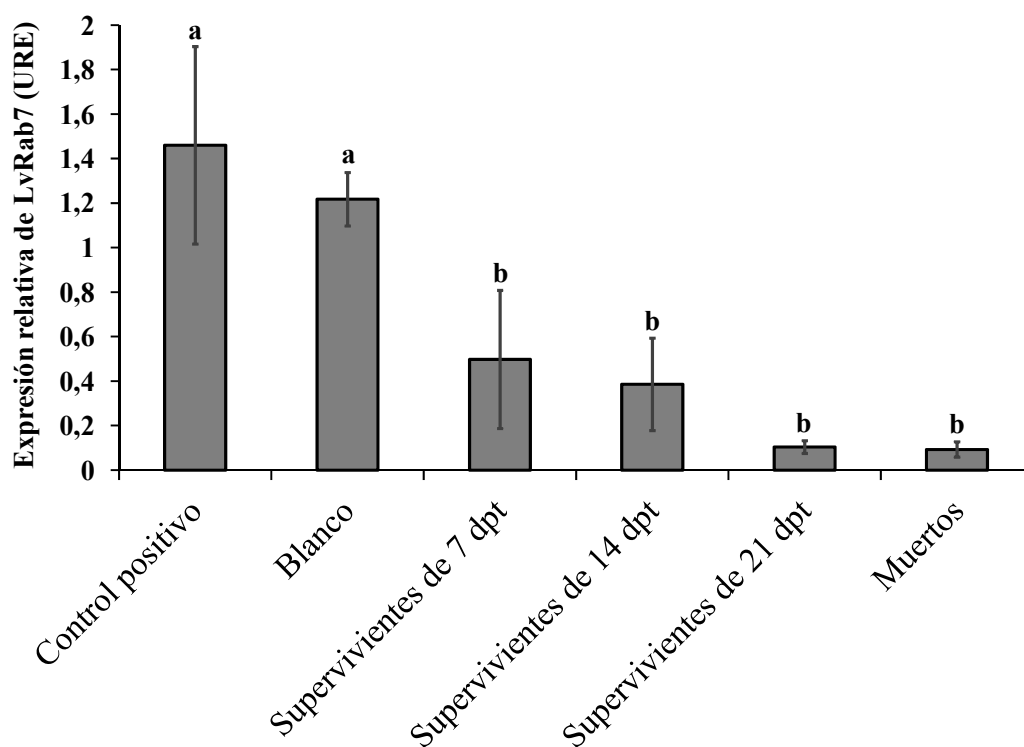


Figura 22. Expresión relativa de LvRab7 estimada en tejido branquial de reproductores (*L. vannamei*) experimentales. Las muestras fueron divididas en grupos de cinco animales. Control positivo (Sin dsRNA + WSSV). Blanco (Sin dsRNA y sin virus). Supervivientes (Camarones supervivientes de los retos a 7, 14 o 21 dpi). Muertos (Camarones que murieron durante los experimentos). La expresión de LvRab7 fue normalizada contra los genes 40S-S24, Factor de elongación y Ubiquitina. Las letras diferentes arriba de las barras indican diferencia entre grupos con 95% de confianza.

El análisis de expresión relativa en los camarones tratados con LvRab7-dsRNA y que sobrevivieron a la infección, mostró una disminución gradual de mRNAs en los tres experimentos cuando la comparamos con el Blanco y el control positivo. Estos resultados demostraron que el silenciamiento perdura cuando el RNAi es dirigido al gen endógeno LvRab7 (Figura23).

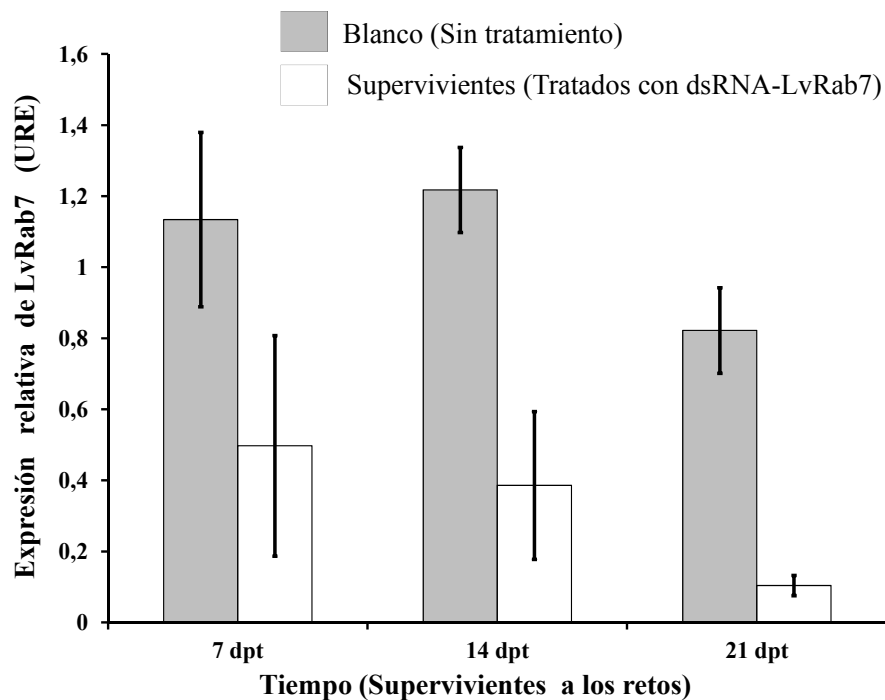


Figura 23. . Expresión relativa de LvRab7 de reproductores de *L. vannamei* supervivientes y blancos de los experimentos de reto a los 7, 14 o 21 dpt. La expresión fue normalizada contra tres genes de referencia (40S-S24, Factor de elongación y Ubiquitina).

### Resultados en el Laboratorio de Producción de Postlarvas (YAMETO)

#### Registro de desoves colectados de hembras tratadas con dsRNA-LvRab7 y sin tratamiento con dsRNA.

Durante el experimento en el laboratorio YAMETO se colectaron y contabilizaron las hembras parchadas del tratamiento con dsRNA-LvRab7 a los 12 y 22 dpt. Se estimó el total de nauplios obtenidos y se dividieron entre el número de hembras que desovaron (Tabla VI).

Tabla VI. Número de hembras colectadas para desovar a los 12 y 22 días post tratamiento y número de nauplios obtenidos en los desoves.

<b>Tratamiento</b>	<b>Desove (dpt)</b>	<b>Hembras parchadas</b>	<b>Nauplios (Total)</b>	<b>Nauplios por hembra</b>
dsRNA-LvRab7	12	5	360,000	72,000
	22	7	240,000	34,285
Control negativo	12	120	15,360,000	128,000
	22	70	8,400,000	120,000

El número de hembras parchadas en el tratamiento, así como el número de nauplios obtenidos de ellas en los desoves a los 12 y 22 dpt fue menor que en las hembras sin tratamiento (Figura 24).

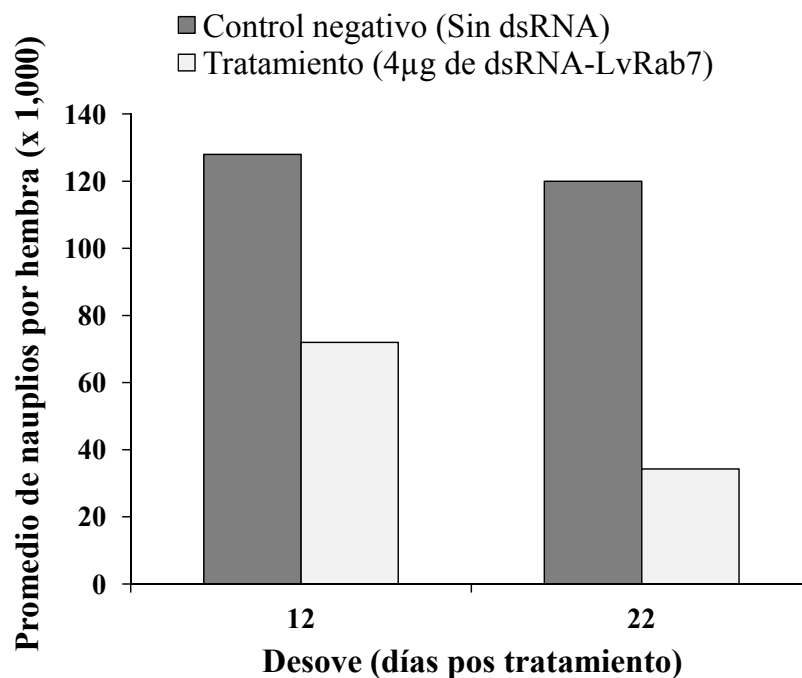


Figura 24. Número de nauplios por hembra obtenidos a los 12 y 22 dpt de las hembras tratadas con dsRNA-LvRab7 y del control negativo (sin dsRNA).

Se realizó una evaluación visual de los huevos y nauplios descendientes de hembras tratadas y no tratadas.

A pesar de que la fecundidad fue menor en hembras tratadas con dsRNA-LvRab7, no se encontraron diferencias morfológicas evidentes entre los huevos y nauplios de hembras tratadas y sin tratamiento (Figura 25).

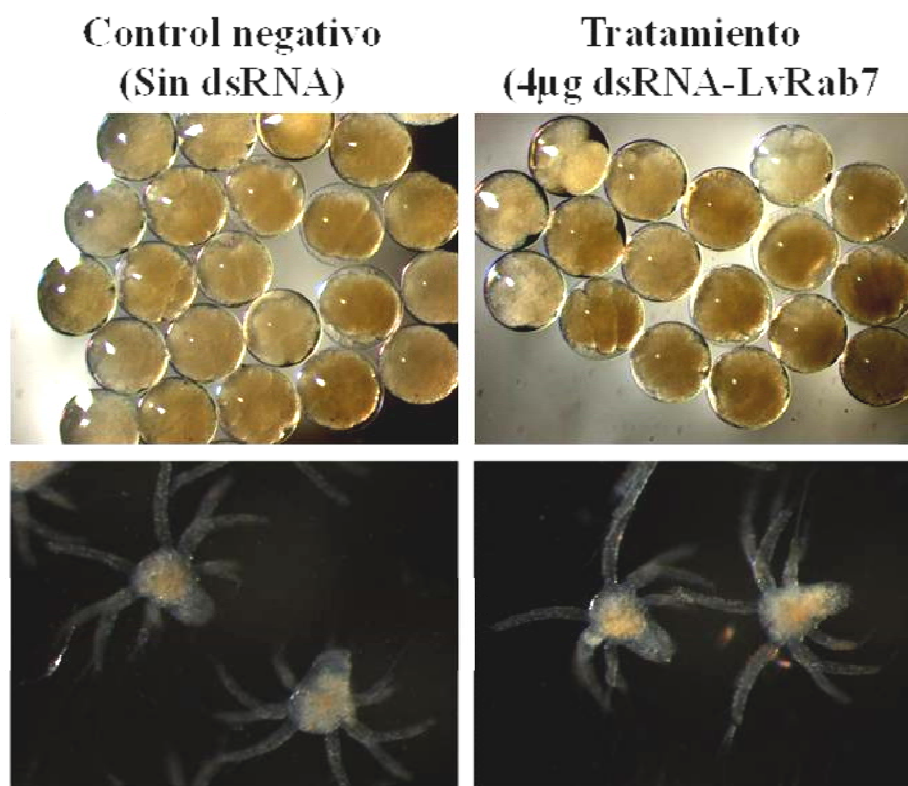


Figura 25.- Huevos y nauplios de las hembras bloqueadas con dsRNA-LvRab7 y hembras no bloqueadas (control).



### Efecto contra WSSV en hembras reproductoras de *L. vannamei* a 83 días post tratamiento con dsRNA-LvRab7

Una vez transportadas las hembras reproductoras al CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa, se monitoreó su comportamiento y se registró la mortalidad en las tinas de aclimatación. A su arribo al CIIDIR, las hembras presentaban lesiones en la cutícula y coloración rojiza en el cefalotórax. El porcentaje de mortalidad durante la aclimatación fue del 60 % en las hembras tratadas con dsRNA y 10 % en los organismos sin tratamiento.

En el experimento de reto contra WSSV, la mortalidad en el control positivo alcanzó el 100% a las 30 hpi y en los organismos tratados a las 48 hpi. No hubo organismos muertos en el control negativo (Figura 26).

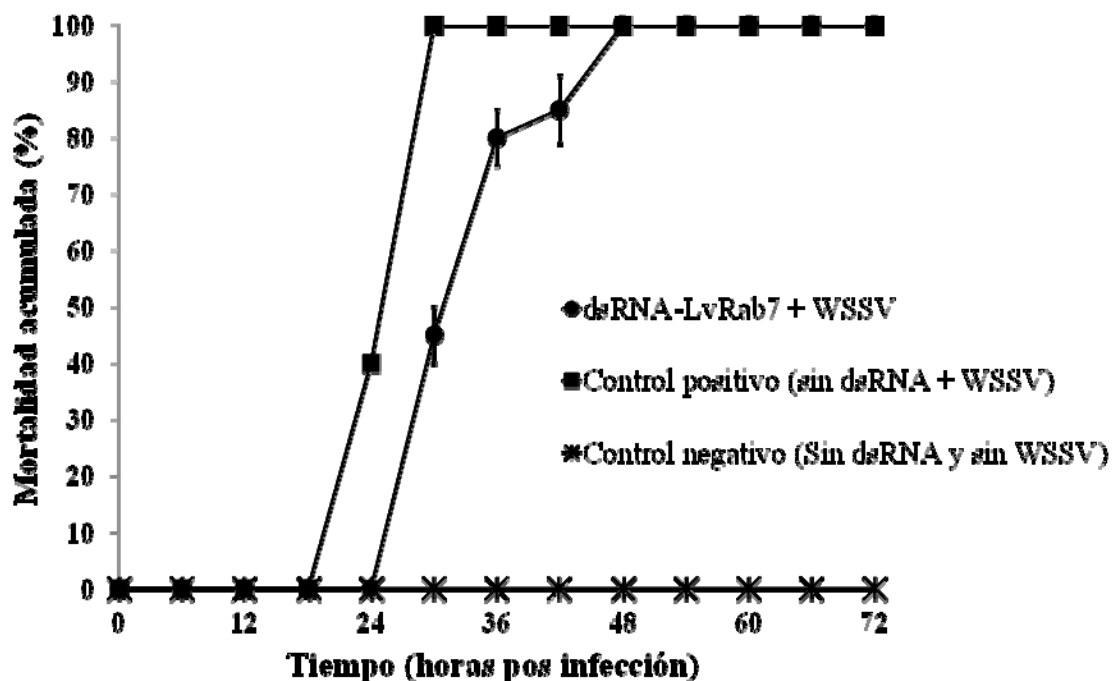


Figura 26. Mortalidad acumulada de hembras reproductoras de *Litopenaeus vannamei* tratadas con 4 µg de dsRNA-LvRab7 y retos contra WSSV 83 días después del tratamiento.

Se detectó mediante PCR la presencia de WSSV en todos los camarones muertos. En contraste no se logró detectar la presencia de WSSV en los organismos del control negativo.

### **Respuesta de la progenie de hembras de camarón tratadas con dsRNA-LvRab7 ante una infección por el virus de la mancha blanca**

#### **Infección con WSSV (100 DI) por vía intramuscular en la progenie de hembras tratadas con dsRNA-LvRab7**

Se transportaron dos lotes de camarones juveniles del laboratorio de producción YAMETO a las instalaciones del CIIDIR-Sinaloa. Uno de descendientes de las hembras tratadas con dsRNA-LvRab7 y otro de hembras sin tratamiento.

La mortalidad inició al mismo tiempo en el control positivo y tratamiento a las 30 horas posteriores a la inyección de WSSV (100 DI). Los camarones del control positivo y del tratamiento alcanzaron 100% de mortalidad a las 48 y 54 hpi respectivamente. Por otro lado, no hubo mortalidad en los organismos del control negativo (figura 27).

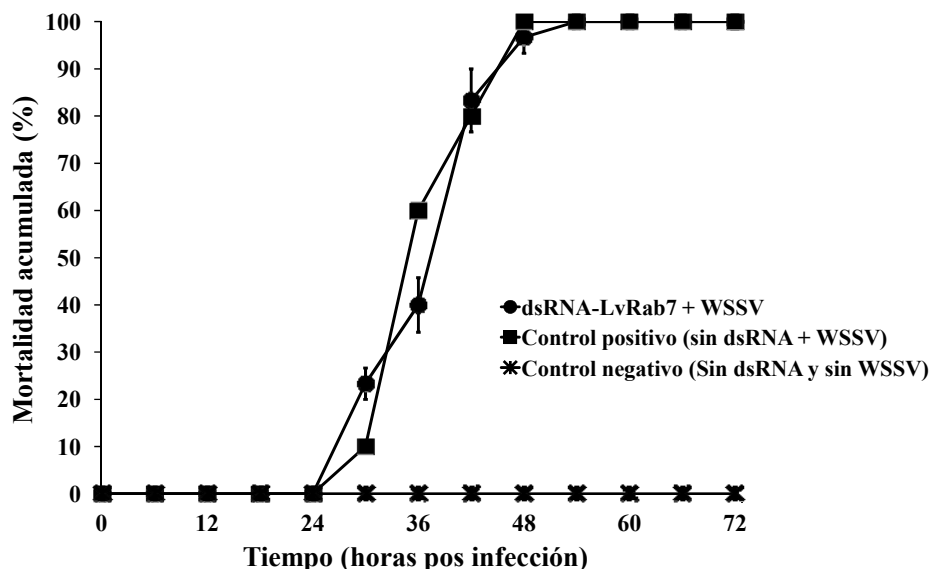


Figura 27. Mortalidad acumulada en la progenie de hembras reproductoras de *Litopenaeus vannamei* tratadas con 4  $\mu$ g de dsRNA-LvRab7 y retada contra 100 Dosis Infecciosas de WSSV suministradas por vía intramuscular.

### Infección con WSSV por ruta oral en la progenie de hembras tratadas con dsRNA-LvRab7

Con la finalidad de simular una ruta de infección natural, se repitió el experimento anterior, en este caso se inoculó el WSSV a los camarones experimentales suministrándoles a manera de alimento, tejido de camarones infectados.

La mortalidad inició en el tratamiento a las 30 hpi y en el control positivo a las 42 hpi. Los camarones del tratamiento alcanzaron 100% de mortalidad a las 54 hpi. Por otro lado, la mortalidad en el control positivo no alcanzó el 100 %. Al finalizar el experimento, no hubo mortalidad en los organismos del control negativo (figura 28).

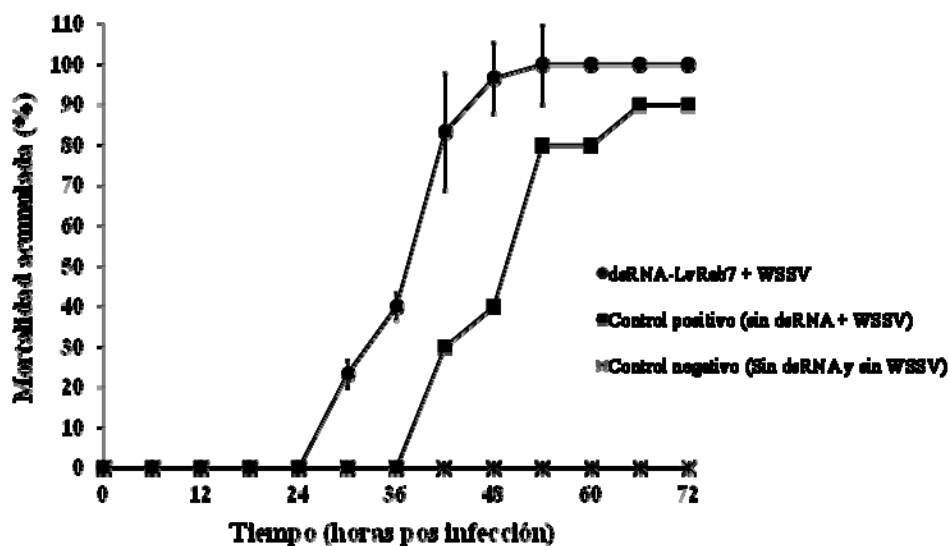


Figura 28. Mortalidad acumulada en la progenie de hembras reproductoras de *Litopenaeus vannamei* tratadas con 4  $\mu$ g de dsRNA-LvRab7 y retada contra WSSV por vía oral con tejido infectado como alimento.

### Evaluación del silenciamiento de LvRab7 mediante RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR) en camarones tratados con 4 $\mu$ g de dsRNA

Las curvas estándar se realizaron con diluciones de un pool de cDNA preparado con 5  $\mu$ l de todas las muestras experimentales.

Los resultados de eficiencia y pendiente de las curvas se muestran en la Tabla VII:

Tabla VII. Eficiencia de la reacción de qPCR con Oligonucleótidos que amplificaron genes de referencia y LvRab7 en este estudio (E), linealidad de la curva estándar (R), ciclo de intersección del umbral (Cq) y cantidad de Oligonucleótidos utilizados en cada reacción.

Oligonucleótidos	Gen	Cq	E (%)	Primer ( $\mu$ M de cada uno)	R
<b>qRab7 (1)</b>	<b>LvRab7</b>	<b>12</b>	<b>94.1</b>	<b>0.2</b>	<b>0.999</b>
q18S (1)	18S	14	83.2	0.46	0.995
<b>q18S (2)</b>	<b>18S</b>	<b>14</b>	<b>86.9</b>	<b>0.46</b>	<b>0.999</b>
<b>qLvan-Ef</b>	<b>Ef</b>	<b>19</b>	<b>99.2</b>	<b>0.46</b>	<b>0.994</b>
qLvanL8	Lvan L8	22	83.1	0.46	0.985
qLvan GAPDH	GAPDH	30	96.4	0.46	0.979
qLvan S12	S12	22	83.1	0.46	0.994
<b>qLvan UBIQ</b>	<b>Ubiquitina</b>	<b>21</b>	<b>90.2</b>	<b>0.46</b>	<b>0.997</b>
<b>qLvan 40S-S24</b>	<b>40S-S24</b>	<b>25</b>	<b>93.1</b>	<b>0.46</b>	<b>0.986</b>
<b>qLvan TUB</b>	<b>Tubulina</b>	<b>24</b>	<b>89.9</b>	<b>0.46</b>	<b>0.998</b>

Para analizar la expresión de LvRab7 en los camarones tratados, fueron seleccionados cinco genes de referencia [18S(2), Lvan Ef(1), LvanUBIQ, Lvan40S-S24 y LvanTUB].

### Estabilidad de los genes de referencia

Para determinar la estabilidad de los genes de referencia, los resultados de **Cq** de las muestras fueron analizados mediante RefFinder (de acceso libre en la Web) (<http://www.leonxie.com/referencegene.php>). Esta herramienta integra análisis de estabilidad con diferentes algoritmos estadísticos (geNorm, Normfinder, BestKeeper y el método comparativo de  $\Delta Ct$ ). De aquí que el análisis de expresión relativa se realizó al normalizar la expresión de LvRab7 contra Lvan40S-S24, Lvan Ef(1) y LvanUBIQ.

### Expresión relativa de LvRab7 en tres tejidos de camarones tratados con dsRNA-LvRab7

La expresión relativa en hemocitos indica que el silenciamiento alcanza su máximo efecto a los dos días post tratamiento (dpt), sin embargo, la expresión tiende a recuperarse de los siete dpt en adelante (Figura 29).

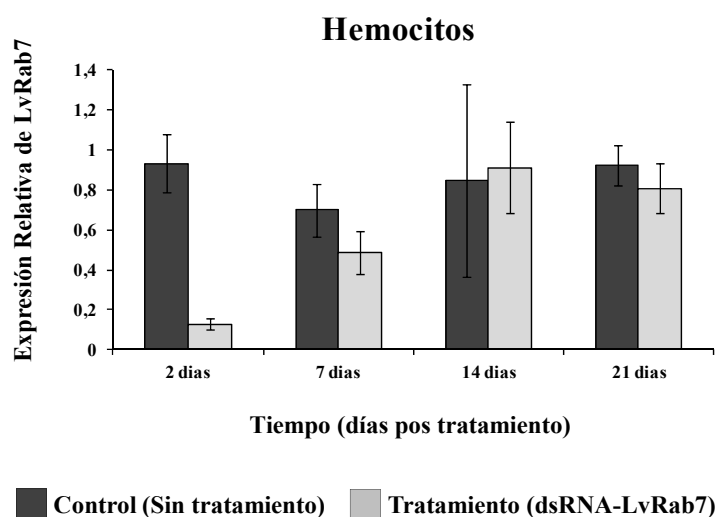


Figura 29. Expresión relativa de LvRab7 en hemocitos de camarones tratados con dsRNALvRab7 y sin tratamiento (control). Las muestras fueron colectadas a diferentes tiempos post tratamiento (2, 7, 14 y 21 días).

De la misma forma, en las branquias y pleópodos, se presentó la mínima tendencia en la expresión a los dos dpt, pero en estos casos el silenciamiento se mantuvo hasta el último día de toma de muestras (Figuras 30 y 31).

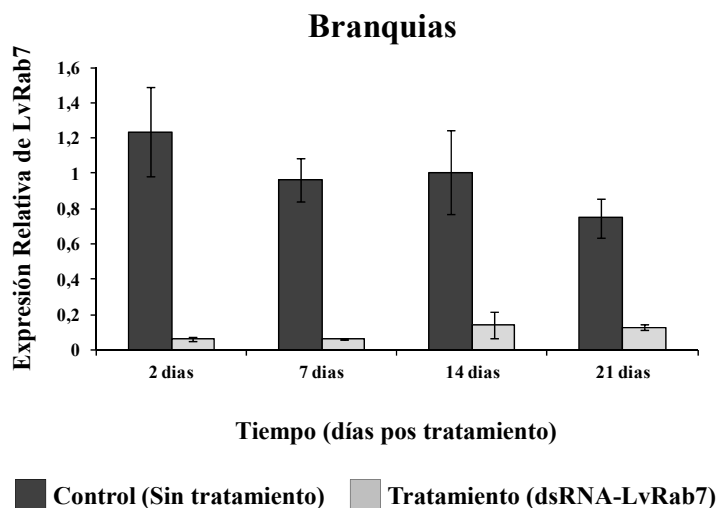


Figura 30. Expresión relativa de LvRab7 en tejido branquial de camarones tratados con dsRNALvRab7 y sin tratamiento (control). Las muestras fueron colectadas a diferentes tiempos post tratamiento (2, 7, 14 y 21 días).

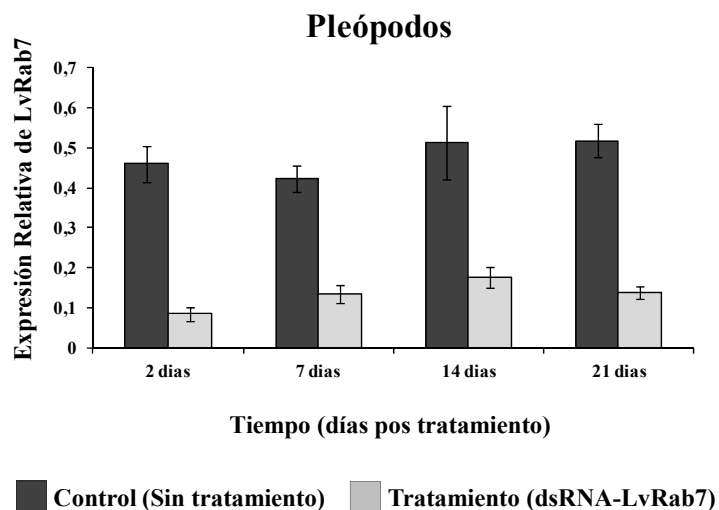


Figura 31. Expresión relativa de LvRab7 en pleópodos de camarones tratados con dsRNALvRab7 y sin tratamiento (control). Las muestras fueron colectadas a diferentes tiempos post tratamiento (2, 7, 14 y 21 días).

## Discusión

La camaronicultura es una de las ramas más importantes de la acuicultura debido a los volúmenes de producción y al valor comercial del camarón (FAO, 2012), sin embargo, las enfermedades virales han sido la principal causa de pérdidas en esta industria en diferentes regiones del mundo (Escobedo-Bonilla et al., 2008). Dentro de estas, WSSV es el principal problema de enfermedad en granjas de camarón a nivel mundial.

Por lo anterior, se han implementado diferentes herramientas biotecnológicas encaminadas a eliminar o reducir el efecto de los virus en el cultivo de camarón. En la última década, la terapia contra enfermedades virales basada en el RNA de interferencia (RNAi), ha sido promisoría en diversos organismos (Golbère-Garapin et al., 2005).

En la actualidad, la tecnología del RNAi es considerada como una herramienta muy poderosa, tanto para identificar la función de genes como para combatir enfermedades, mediante la supresión génica de manera post transcripcional y específica de genes endógenos y de genes de patógenos (Haasnoot et al., 2003; Shekhar y Lu, 2009).

El bloqueo de genes virales mediante RNAi inducido por RNA de doble cadena (dsRNA) o por pequeños RNAs de silenciamiento (siRNA) se ha aplicado como estrategia en el combate contra algunas de las enfermedades virales más agresivas que afectan al camarón. El RNAi ha sido probado exitosamente contra el virus de la mancha blanca (WSSV) y el virus de la cabeza amarilla (YHV) que afectan a diversas especies de camarones cultivados en todo el mundo. Algunas especies de camarón en las que se han tenido resultados favorables contra virus son *Penaeus japonicus*, *Penaeus monodon*, *Penaeus chinensis* y *Litopenaeus vannamei* (Robalino et al., 2004, 2005; Xu J. et al., 2007; Tirasophon et al., 2007; Kim et al., 2007; Rijiravanich et al., 2008).

Se ha mencionado que la aplicación de dsRNA contra genes virales elimina completamente la expresión del gen (knock out), ya que erradicó a WSSV y YHV en camarones tratados e infectados experimentalmente (Tirasophon et al., 2007; Xu J. et al., 2007; Sarathi et al., 2008). Uno de los avances más recientes en la terapia contra enfermedades virales en camarón ha sido el descubrimiento de factores involucrados en el mecanismo de infección

de estos virus, tal es el caso de la proteína Rab7 en camarón que está envuelta en el mecanismo de infección del WSSV (Sritunyalucksana et al., 2006).

A diferencia de los genes virales, los genes endógenos de camarón parecen no ser 100% efectivos en el silenciamiento. Por ejemplo, el silenciamiento del gen Rab en *M. japonicus* tuvo un efecto inhibitor desde las 8 horas post tratamiento (hpt), alcanzando una aparente supresión total a las 72 hpt. Sin embargo, la expresión parece recuperarse a partir de las 96 hpt (Zong et al., 2008).

En trabajos recientes, el dsRNA se ha utilizado para bloquear el gen Rab7 como una estrategia antiviral contra el WSSV en juveniles de *M. japonicus* y *P. monodon*. Como la secuencia de este gen fue aislada de *P. monodon*, la nombraron PmRab7 (Wu. et al., 2008; Ongvarrasopone et al., 2008; Attasart et al., 2009). En un experimento de bloqueo contra PmRab7, se reportó que la depleción del mRNA fue parcial, sin embargo, fue suficiente para tener un efecto antiviral contra el WSSV y YHV (Ongvarrasopone et al., 2008).

En el presente estudio se aisló y clonó un fragmento homólogo a Rab7 en reproductores de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) de México. El tamaño de este fragmento corresponde a la secuencia completa del marco de lectura abierta (ORF) del gen Rab7 y fue del mismo tamaño y con una secuencia muy similar a la reportada en *L. vannamei* de Tailandia. La secuencia de nucleótidos tuvo >94% de homología con las dos especies Asiáticas, sin embargo, la secuencia de aminoácidos fue idéntica. Estos resultados indican que Rab7 es una proteína conservada entre especies de camarón.

De acuerdo a la nomenclatura usada para identificar a Rab7 en *P. monodon* (PmRab7), la secuencia homóloga a Rab encontrada en *L. vannamei* de este estudio fue nombrada LvRab7.

La familia Rab es parte de la superfamilia Ras de pequeñas GTPasas. Algunas Rab-GTPasas son conservadas desde levaduras hasta humanos. Las Rab-GTPasas están localizadas en la fase citosólica de compartimentos intracelulares específicos y ampliamente relacionadas con el mecanismo de endocitosis, donde participan en el desarrollo de membranas para formar vesículas, transportándolas a destinos particulares y finalmente fusionándolas con membranas diana de organelos en otra región de la célula (Rodman y Wandinger-Ness, 2000; Stenmark y Olkkonen, 2001).



Algunos virus entran a la célula por su unión a receptores y el uso del mecanismo de endocitosis para internarse a las células, lo cual da como resultado una infección viral (Sodeik, 2000). Algunos virus envueltos como Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) y Dengue virus (DENV) requieren Rab5 y Rab7 para entrar en las células de mosquitos (Colpitts et al., 2007; van der Schaar et al., 2008) y otros como Semliki Forest virus y vesicular stomatitis virus sólo necesitan Rab5 para infectar las células (Sieczkarski y Whittaker, 2002). Se ha visto que el silenciamiento de Rab5 y Rab7 producen una disminución de la replicación de algunos virus. Por ejemplo, el silenciamiento de Rab5 y Rab7 disminuyó significativamente la replicación del virus de Hepatitis C (HCV) en cultivos celulares (Manna et al., 2010).

En camarón, el bloqueo de Rab7 con anticuerpos (anti-Rab7) o su silenciamiento mediante RNAi aumentó significativamente la supervivencia en camarones juveniles y en reproductores retados contra WSSV (Sritunyalucksana et al., 2006; Ongvarrasopone et al., 2008; Attasart et al., 2009; Alvarez-Ruiz et al., 2012). Recientemente se documentó que el bloqueo de Rab7 en *P. monodon* o *L.vannamei* inhibe la replicación de otros virus como Yellow Head Virus (YHV) (Ongvarrasopone et al., 2008), Leam-Singh Virus (LSNV) (Ongvarrasopone, et al., 2010) y Taura Syndrome Virus (TSV) (Ongvarrasopone et al., 2011).

De aquí, es claro el potencial del silenciamiento de Rab7 como medida preventiva contra WSSV. No obstante, el papel de Rab5 en el transporte intracelular también es importante y está asociado al de Rab7 en el proceso de endocitosis, entonces el bloqueo de Rab5 podría ser una mejor estrategia contra WSSV. Hasta el momento Rab5 no ha sido reportada en camarón, por consiguiente, es necesario realizar investigaciones dirigidas al descubrimiento y caracterización de Rab5 en camarones.

Se sabe que la eficiencia del dsRNA para silenciar la expresión de genes está relacionada con el tamaño de la molécula. Moléculas más grandes tienen un mayor efecto debido a que Dicer produce más siRNAs con cada dsRNA (Dykxhoorn et al., 2003).

Por tal motivo, inicialmente en este trabajo se elaboraron dos construcciones de dsRNA-LvRab7: una secuencia parcial del gen (494 pb) y otra con la secuencia total (618 pb). Los camarones que fueron tratados con 4 $\mu$ g de dsRNA de estas construcciones y retados contra

2500 DI de WSSV lograron un retraso significativo en la mortalidad. Sin embargo, el efecto antiviral en ambos tratamientos fue el mismo. No obstante, en un trabajo con *Drosophila melanogaster* donde se midió la magnitud del silenciamiento de acuerdo a los niveles de expresión del gen bloqueado, se mostró que las moléculas de dsRNA de 500 pb provocaron un silenciamiento más eficiente que las de 100 o 50 pb (Shih et al., 2009). Es posible que en nuestros resultados no haya diferencia en el efecto porque entre un fragmento de dsRNA de 494 y otro de 618 pb la disparidad no es suficientemente grande para observar diferencias importantes en el silenciamiento. Por lo anterior, en los experimentos subsecuentes se trabajó con la secuencia completa de LvRab7 para construir los dsRNAs y con diferentes dosis virales.

Con respecto a las concentraciones de dsRNA-LvRab7 aplicadas por gramo en estudios anteriores, las cantidades han sido variadas. En juveniles de *P. monodon* se aplicaron de 2.5 a 3.5  $\mu\text{g/g}$  de camarón (Ongvarrasopone et al., 2008) y 0.3  $\mu\text{g/g}$  (Attasart et al., 2009). En *L. vannamei* de dos g se aplicaron 0.62  $\mu\text{g/g}$  (Ongvarrasopone et al., 2011).

Para definir si la cantidad de dsRNA o la dosis viral aplicadas a los camarones son factores que interviene en la respuesta contra WSSV, se construyó una matriz de tratamientos con dos cantidades de dsRNA por camarón (4 o 20  $\mu\text{g}$ ) contra dos dosis virales (25 o 2500 DI) de WSSV. La relación de dsRNA-LvRab7 fue de 0.72  $\mu\text{g/g}$  en la dosis alta y 0.14  $\mu\text{g/g}$  en la dosis baja. Estas cantidades caen dentro del intervalo utilizado por otros autores. Sin embargo, en camarones reproductores estas concentraciones inhibieron la replicación de LvRab7 hasta los cinco dpt comparado con dos dpt reportado en juveniles.

Después de los experimentos de reto, los camarones reproductores tratados con 4 o 20  $\mu\text{g}$  de dsRNA-LvRab7 y retados contra una dosis alta de WSSV (2500 DI) mostraron un retraso significativo en el tiempo de mortalidad. Sin embargo, al final del experimento (240 hpi) ambos tratamientos produjeron el mismo efecto (80% de mortalidad). Estos resultados indicaron que el silenciamiento de LvRab7 en reproductores de *L. vannamei* produce un efecto protector contra WSSV. Sin embargo, este efecto es diferente al reportado en juveniles de *P. monodon* (Ongvarrasopone et al., 2008).

En contraste, bajo las mismas condiciones experimentales, pero usando una dosis baja de WSSV (25 DI), el efecto antiviral aumentó significativamente. La mortalidad alcanzó 33 y

44 % en los tratamientos con 4 o 20  $\mu\text{g}$  de dsRNA respectivamente. Estos resultados concuerdan con un trabajo previo donde usaron dsRNA-PmRab7 en juveniles de *P. monodon* donde se obtuvo 45% de mortalidad en un experimento de reto contra WSSV (Attasart et al., 2009).

Estos resultados indican que el silenciamiento de LvRab7 mediante dsRNA en reproductores de camarón retrasa la mortalidad, y que el efecto antiviral es dependiente de la dosis viral aplicada a los organismos. Además se observó que con altas dosis virales se puede abrumar el mecanismo de RNAi al silenciar genes endógenos. La posible explicación a este fenómeno puede correr en tres vertientes. (1) Aunque todavía no se sabe con exactitud cuánto tiempo tarda el WSSV en replicarse, por la letalidad que produce, se infiere que se replica con mucha eficiencia bajo las condiciones apropiadas y aunque el mecanismo de RNAi ha demostrado ser una herramienta potente para detener la replicación de los virus en la célula, es posible que debido a la gran cantidad de partículas virales, esta replicación sea más veloz que la destrucción de mRNAs mediante RNAi. Por lo tanto, antes de que el sistema de RNAi se establezca al grado de otorgar protección contra el virus, el organismo alcanza un nivel de daño demasiado elevado para seguir resistiendo la infección y muere. (2) Las proteínas virales conocidas como “supresores virales del silenciamiento con RNAs” (VSRs por sus siglas en inglés) tienen la habilidad de inhibir el mecanismos de RNAi. Actualmente estas proteínas han sido identificadas en casi todos los virus de plantas y en algunos virus de mamíferos e insectos (Ding et al., 2010). Recientes estudios han revelado que las VSRs interactúan con diversos componentes involucrados en el silenciamiento, inhibiéndolo por medio de múltiples mecanismos (Jiang et al., 2012). De aquí, es posible que el WSSV produzca algún componente que inhiba al mecanismo de RNAi. Por lo tanto, grandes dosis virales podrían bloquear completamente el silenciamiento y desencadenar la mortalidad. (3) Otra posibilidad es que la infección realizada por la vía intramuscular sea demasiado agresiva, y con grandes concentraciones virales, el organismo no tenga tiempo de prepararse para repeler al virus. En este sentido, actualmente se sabe que los camarones utilizan diversos mecanismos para defenderse del WSSV, dentro de los que destacan los mecanismos de apoptosis y fagocitosis (Wang y Zhang, 2008; Leu y Lo, 2011; Ye et al., 2012 a y b). En una infección con WSSV en *P.*

*japonicus*, los mRNAs de caspasa, un efector de la apoptosis, se sobre expresaron, lo que indicó que la apoptosis es un mecanismo de defensa contra WSSV en camarones (Wang et al., 2008). La mayoría de los virus entran a sus huéspedes por la mucosa de las vías respiratoria o gastrointestinal. En el caso del camarón, la vía de entrada del WSSV serían las células epiteliales del aparato digestivo y de las branquias. De esta manera se lleva a cabo una infección primaria, donde la cantidad de virus que infectan al organismo no es muy elevada, y es aquí donde la apoptosis podría jugar un papel importante contra WSSV. Una vez que la replicación viral en las células epiteliales es eficiente, los nuevos viriones pasan al seno hemolinfático, provocando la evolución de la infección de una fase primaria a una secundaria. Las evidencias indican que en este paso de la infección, la fagocitosis actúa como mecanismo de defensa contra WSSV (Li y Xiang, 2012). Se ha reportado que algunos individuos de *P. japonicus* que sobre expresaron Rab6 resultaron resistentes contra WSSV (Wu y Zhang, 2007) y recientemente se descubrió que la proteína Rab6 regula al mecanismo de fagocitosis contra infecciones virales en invertebrados (Ye et al., 2012 b). Es posible que la expresión de Rab6 u otro efector desconocido de fagocitosis en camarón, utilicen la infección primaria como señal para estimular su expresión. En este estudio, el virus se inoculó por vía intramuscular, por lo que la infección inició en la fase secundaria y dada la velocidad de replicación del WSSV, el mecanismo de RNAi no fue capaz de detener la infección contra una dosis alta de virus, pasando así a una fase terciaria, donde la infección es sistémica y generalmente letal.

La mortalidad registrada en los camarones tratados con dsRNA-LvRab7 de este estudio, fue muy elevada cuando se retaron contra dosis virales altas. Estos resultados fueron similares a estudios previos donde el silenciamiento fue dirigido hacia genes virales, por lo que se demostró que el efecto antiviral es inversamente proporcional a la cantidad de virus suministrada (Xu et al., 2007; Sarathi et al., 2007; Wu Y. et al., 2007).

En el presente estudio se encontró que el silenciamiento de LvRab7 es más evidente hasta las 120 hpt. Esto contrasta con lo reportado anteriormente en juveniles de *P. monodon*, donde la mayor inhibición se dio a las 48 hpt (Ongvarrasopone et al., 2008). Otro estudio realizado con juveniles de *L. vannamei* mostró la inhibición completa del gen a las 48 hpt

(Ongvarrasopone et al., 2011). Esto sugiere que la edad y/o el tamaño del camarón pueden influir en la inhibición de los mRNAs de genes endógenos de camarón.

Los resultados de este trabajo mostraron bajas mortalidades cuando los reproductores son retados contra WSSV a las 48 hpt. Esta mortalidad pudo deberse a la presencia de proteínas LvRab7 presentes en la células de los organismos experimentales antes del silenciamiento. Una explicación a este fenómeno, es que las proteínas Rab son moléculas que pueden reciclarse al pasar de una forma inactiva (Guanosin Di Fosfato GDP) a una forma activa (Guanosin Tri Fosfato GTP). Por lo tanto, su periodo activo puede ser prolongado. En su estado inactivo, Rab se encuentra en el citoplasma unida a un inhibidor de la disociación de GDP (GDI), cuando Rab es requerida como transportador de vesículas endocíticas, pasa a través de una proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina (GEF) en la parte interna de la membrana celular, la cual induce a intercambiar su GDP por GTP, en esta forma, Rab se une a la vesícula y la transporta hacia la membrana objetivo donde se une a otros efectores Rab para fusionar la membrana vesicular con la membrana del compartimento objetivo. Posteriormente la proteína Rab hidroliza su GTP, liberándose al citoplasma como Rab-GDP, donde se une nuevamente a GDI para ser reusada en un nuevo proceso de transporte (Van der Sluijs y Gerez, 1999; Sritunyalucksana et al., 2006; Markgraf et al., 2007; Corbeel y Freson, 2008).

Aunque después del silenciamiento, los mRNAs de LvRab7 disminuyen, es posible que las proteínas ya existentes realicen su función durante su periodo habitual de vida, por lo tanto, la mortalidad en el experimento donde se silenció LvRab7 pudo deberse a que la cantidad de proteínas LvRab7 que ya había antes del tratamiento fueron suficientes para transportar al virus mediante endocitosis y llevar a cabo la infección.

Por otro lado, existe la posibilidad de que el virus utilice un mecanismo alterno e independiente de LvRab7 para infectar las células de camarón. Sin embargo, hasta el momento no ha sido descrito.

En conclusión, el silenciamiento de LvRab7 en reproductores de *L. vannamei* mostró una modesta respuesta antiviral contra WSSV. La mayor inhibición de LvRab7 ocurrió hasta las 120 hpt y una cantidad mayor de dsRNA no mejoró el efecto contra WSSV ni redujo la

mortalidad. Sin embargo, el efecto antiviral fue dosis dependiente de la cantidad de virus utilizada en el ensayo de reto.

De conformidad con la revisión de la literatura científica, no se conocen estudios sobre la duración de la protección contra WSSV a un plazo mayor de dos dpt, ni del efecto del silenciamiento de LvRab7 en los camarones después de 12 días. El primer estudio de silenciamiento dirigido a Rab7 en camarones fue realizado en juveniles (siete a diez g) de *P. monodon* infectados experimentalmente a los dos dpt con una duración de 9 días (Ongvarrasopone et al., 2008). Después, en *P. monodon* de 300 mg que fueron infectados al tercer dpt, dándoles seguimiento hasta los 11 días (Attasart et al., 2009) y en reproductores de *L. vannamei* ( $27.5 \pm 2.5$  g) infectados a dos dpt y conservados durante 12 dpt (Álvarez-Ruiz et al., 2012). Además en el silenciamiento de Rab7 en camarones retados contra otros virus (LSNV o TSV) el seguimiento ha sido por menos de una semana (Ongvarrasopone et al., 2010 y 2011). En el presente estudio, por primera vez se dio seguimiento a camarones *L. vannamei* tratados con dsRNA-LvRab7 durante cuatro semanas posteriores al tratamiento.

Para determinar el efecto del silenciamiento de Rab7 contra WSSV durante un periodo de tiempo más prolongado, se trató a un lote de reproductores con 5  $\mu$ g de dsRNA-LvRab7 por animal y se realizó el primer reto contra el virus hasta los siete dpt. Sorpresivamente no hubo mortalidad en este experimento. Este resultado indicó que el efecto antiviral es óptimo después de siete días. Este es el primer experimento donde se mantuvieron camarones con Rab7 silenciado durante periodos de tiempo por más de dos días antes de ser retados contra WSSV. Además, es el primer reporte de cero mortalidades en camarones que fueron retados contra WSSV después de siete días de tratamiento con dsRNA orientado a silenciar la expresión de LvRab7.

Los resultados obtenidos en los siguientes retos a los 14 y 21 dpt mostraron 40 y 27 % de mortalidad respectivamente. Sorpresivamente no se logró detectar al WSSV en los camarones que murieron durante los experimentos.

Los resultados de RT-PCR mostraron una disminución gradual en la expresión de LvRab7 en los camarones tratados durante un mes. Este silenciamiento produjo un potente efecto antiviral ya que no se logró detectar al WSSV en los camarones retados a los 7, 14 y 21 días después de ser tratados con dsRNA-LvRab7 y la mortalidad atribuible a WSSV fue de

0%. En contraste con estos resultados, en estudios previos con dsRNA-LvRab7 y retos dos días después contra WSSV, el virus fue detectado mediante PCR en los animales muertos durante el experimento (Attasart et al., 2009; Alvarez-Ruiz et al., 2012), lo que sugiere que el tiempo transcurrido entre el inicio de la interferencia y la disminución de la expresión de LvRab7 puede modificar la respuesta a la infección por WSSV y que la protección antiviral en reproductores es más efectiva siete días después de la aplicación de la dosis de dsRNA-LvRab7.

Por otra parte, la mayor efectividad del silenciamiento a siete dpt con respecto a dos dpt puede estar relacionada con la vida media de las proteínas Rab7 sintetizadas antes del silenciamiento. Sin embargo, el tiempo medio de vida de Rab7 en humanos es de ~28 horas (Ganley et al., 2004). Algunos estudios revelaron que el último aminoácido de la cadena (N-terminal) que forma la proteína, indica el tiempo medio de vida de ésta (Bachmair et al., 1986). Rab7 en camarones tiene cisteína en su región N-terminal, lo que la cataloga como una proteína de vida media. No obstante, hasta el momento no hay información acerca del tiempo de vida de la proteína Rab7 en camarones.

La no detección del WSSV en camarones tratados con dsRNA-LvRab7 y retos contra el virus, a los 7, 14 o 21 dpt, indica que el silenciamiento de LvRab7 produce un efecto contra WSSV que se mantiene, al menos, por tres semanas después de la aplicación del dsRNA. Estos resultados contrastan con una investigación previamente reportada en juveniles, donde animales tratados con dsRNA para interferir genes virales (VP28 o VP26) y retos contra WSSV a diez o 20 días post tratamiento, se detectó que pierden gradualmente el efecto antiviral, posiblemente porque la duración del efecto depende de la presencia del virus como lo reportaron Mejía-Ruiz et al., (2011) reportaron que las reinfecciones en *L. vannamei* prolongan el efecto del RNAi.

Por otra parte, la no detección de WSSV en camarones muertos durante los experimentos en este trabajo sugiere que murieron por otra causa, probablemente por el tratamiento, ya que los camarones blanco no sufrieron ningún tipo de alteración. Además, ésta es la primera vez que no se detecta WSSV en animales tratados con dsRNA-LvRab7 y retos contra WSSV que murieron durante los experimentos de reto. Estos resultados coinciden con un trabajo reportado donde el silenciamiento del gen endógeno proteína receptora de

laminina (Lams) de *L. vannamei*, que sirve como receptor del virus del taura (TSV), es letal para los camarones (Senapin et al., 2010).

Para determinar la condición de LvRab7 en los camarones experimentales, se evaluó su expresión mediante RT-PCR. Coincidentemente los camarones muertos tuvieron expresión no detectable comparada con los sobrevivientes y los controles. Esta expresión se verificó mediante RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR) al separar a los camarones experimentales en seis grupos, de acuerdo a sus características específicas: 1) Blanco 2) Control positivo 3) Sobrevivientes de 7dpt 4) Sobrevivientes de 14dpt 5) Sobrevivientes de 21dpt y 6) Muertos. Estadísticamente las muestras se dividieron en dos grandes grupos (tratados y no tratados), sin embargo, la expresión de LvRab7 disminuye gradualmente en función del tiempo. Además los camarones muertos presentaron los niveles de expresión más bajos. Este resultado refuerza la hipótesis de que el silenciamiento eficaz de LvRab7 puede ser letal para los organismos.

La interrogante del porqué el silenciamiento perdura al bloquear un gen endógeno en contraste con un gen viral puede ser explicada por el descubrimiento de un sistema que potencia el efecto del RNAi en otros invertebrados. Algunos autores sugieren que en las células de invertebrados se lleva a cabo una construcción de pequeños RNAs con la capacidad de incrementar la respuesta de RNAi de una forma similar a las plantas (Siomi y Siomi, 2009). Lipardi y Paterson en 2010 mostraron que al introducir secuencias de dsRNA en embriones de mosca de la fruta, se inicia el mecanismo de RNAi y posteriormente algunos siRNAs encuentran su secuencia complementaria en el mRNA correspondiente, para producir nuevo dsRNA. Esto sugirió que *Drosophila* emplea una enzima RNA polimerasa dependiente de RNA para polimerizar la cadena complementaria del RNAm para producir un nuevo dsRNA y así iniciar nuevamente la cascada del RNAi. En *C. elegans* se ha descubierto que el mecanismo de RNAi potencia su efecto al formar siRNAs secundarios (secondary short interfering RNA) sintetizados por RNA-directed RNA polymerases (RdRPs) que usan mRNAs blanco como sustrato para producirlos (Sijen et al., 2007). Es posible que en ausencia de mRNAs objetivo, el mecanismo de RNAi en camarones pierda su efecto. Los resultados del presente trabajo sugieren que el camarón blanco al igual que otros organismos posee un homólogo de RdRP para fortalecer el



mecanismo de RNAi. Sin embargo, hace falta más investigación al respecto para detectar y caracterizar alguna RdRP en camarones.

Hasta el momento no hay reportes de algún efecto adverso relacionado con el silenciamiento de Rab7 en camarones. No obstante, en este estudio se observó que después de 14 dpt los camarones tratados con dsRNA-LvRab7 manifestaron un deterioro significativo en su constitución muscular al compararlos con los animales sin tratamiento. Estos resultados sugieren que el bloqueo de LvRab7 interfiere con el desarrollo óptimo del camarón y que puede ser letal para reproductores de *L. vannamei*.

Como se mencionó anteriormente, Rab7 juega un papel importante en el mecanismo de endocitosis ya que transporta cargas del endosoma tardío al lisosoma (Bucci et al., 2000). Por ejemplo. Las células animales adquieren colesterol como colesteril ester empaquetado por esfingolípidos y una apoproteína B100, este complejo forma una lipoproteína de baja densidad (LDL) que es endocitada mediante un receptor de membrana y transportada en un endosoma tardío hasta lisosoma. Ahí, el colesteril ester es hidrolizado y finalmente liberado como colesterol a la membrana plasmática y al retículo endoplásmico (Goldstein et al., 1985). Así, teóricamente al bloquear Rab7 para inhibir la replicación de WSSV se puede interferir el proceso de asimilación de otras moléculas que se internan a las células por endocitosis mediada por Rab7 entre el endosoma temprano y tardío, tales como; lípidos, proteínas, anticuerpos, hormonas y/o factores de crecimiento.

A pesar de los esfuerzos realizados hasta el momento, el virus de la mancha blanca todavía es la principal amenaza contra la industria del cultivo de camarón. Dado que los reproductores son la fuente de postlarvas que se cultivan en las granjas de camarón, es de vital importancia encontrar estrategias para asegurar la ausencia del WSSV en las postlarvas. El periodo reproductivo útil de las hembras de camarón en los laboratorios de producción en México es de aproximadamente 60 días. Por tal motivo es necesario buscar estrategias que protejan a los reproductores contra patógenos durante periodos prolongados de tiempo.

Aunque el mecanismo de RNAi ha demostrado ser una herramienta poderosa para impedir la replicación de WSSV, hasta el momento no se ha encontrado la estrategia adecuada para su aplicación a nivel comercial.

Una vez que se determinó que el efecto de interferencia de LvRab7 perdura, se aplicó el tratamiento a hembras en proceso de reproducción con la finalidad de probar si el efecto se transmite a la progenie.

Para esto, se bloquearon hembras reproductoras con dsRNA de LvRab7 después del proceso de ablación. Posteriormente se le dio seguimiento al proceso reproductivo para determinar si el sistema de RNAi se transfiere a la siguiente generación.

Se ha demostrado que en *D. melanogaster* y *C. elegans*, el sistema de RNAi se transfiere a la progenie (Fire et al., 1998, Grishok et al., 2000, Savitsky et al., 2006). Por lo tanto, si este fenómeno es posible en *D. melanogaster* y *C. elegans* y dado que son invertebrados, entonces es posible que ocurra en camarones.

Recientemente se ha demostrado que el gen Sid-1 es requerido para importar fragmentos de dsRNA hacia y entre las células (Winston et al., 2002; Feinberg y Hunter, 2003). Este fenómeno se ha comprobado en células de insecto cultivadas *in vitro*, por lo que se cree que funciona como un poro para transferir dsRNA de célula a célula (Shih et al., 2009). Recientemente se reportó la existencia de Sid-1 en *L. vannamei* (Lebreuche et al., 2010), por lo tanto, es posible que los ovocitos tengan Sid-1 y por ende que los fragmentos de dsRNA aplicados al reproductor alcancen las células del nuevo organismo para obtener una progenie protegida contra el virus de la mancha blanca.

El primer efecto observado en los experimentos con hembras ablacionadas y tratadas con dsRNA-LvRab7 es que se observó que el número de huevos colectados fue menor en comparación a las hembras sin tratamiento y por lo tanto el número de nauplios producidos fue menor, sin embargo, no se encontraron diferencias morfológicas en los huevos y nauplios entre el tratamiento y el control. Estos resultados sugieren que la disminución de la fertilidad en las hembras tratadas con dsRNA-LvRab7 tuvo efecto únicamente durante el desarrollo de la gónada y que la progenie aparentemente no fue afectada. Este puede ser un indicio de que el sistema de RNAi con dsRNA-LvRab7 no se transfirió a la F1.

En este sentido, se sabe que hormonas como ecdisterol, progesterona y 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona están involucradas con la maduración y Vitelogénesis en crustáceos (Yano, 1985 y 1987). En algunos invertebrados, los esteroides y otros lípidos son requeridos para fabricar las membranas en el crecimiento del embrión. En algunos casos, algunos

derivados de esteroides son absorbidos por los ovocitos mediante endocitosis para ser almacenados como yema. Asimismo, hay datos que señalan el almacenamiento de hormonas esteroideas durante la ovogénesis en invertebrados (Perevozchikov, 2008). La vitelogenina es una proteína muy conservada producida en el hepatopáncreas de crustáceos. Esta proteína forma un complejo con lípidos para ser transportada a los ovocitos y absorbida mediante receptores de membrana (Schonbaum et al., 2000; Perevozchikov, 2008). Dado que la vitelogenina es el principal precursor de las proteínas que conforman la yema de los ovocitos y su internalización se lleva a cabo por endocitosis, entonces es probable que el bloqueo de LvRab7 en las hembras haya interferido con el proceso de desarrollo de la gónada y por lo tanto, la fecundidad fue significativamente menor que en las hembras sin tratamiento.

Una vez finalizado el proceso reproductivo, se evaluó si las hembras tratadas con dsRNA conservaron la resistencia contra el WSSV. El experimento de reto se realizó a los 83 días después de la aplicación del tratamiento y aunque los camarones del control positivo (sin tratamiento) se murieron antes que las hembras tratadas, estas alcanzaron el 100% de mortalidad en un periodo muy corto. Como se mencionó anteriormente, los organismos de este experimento fueron transportados y aclimatados antes del reto contra WSSV, durante este proceso fue evidente el deterioro de los organismos, presuntamente por el estrés que sufren durante el proceso reproductivo. Sin embargo, la mortalidad en la aclimatación fue superior en los camarones tratados con dsRNA (60%) que en los no tratados (10%). En base a resultados anteriores, se reafirma la hipótesis de que el silenciamiento de LvRab7 interfiere con otros mecanismos esenciales en los camarones, ya que los camarones tratados de este experimento estaban visiblemente deteriorados al momento de la aclimatación. Aunado a esto, ambos tratamientos (tratados y controles positivos) alcanzaron el 100% de mortalidad, sin embargo, a pesar del deterioro en los animales tratados, se observó un leve retraso en su mortalidad en comparación con el control positivo. Estos resultados no permitieron determinar contundentemente que la respuesta antiviral producida por el silenciamiento de LvRab7 se mantiene después de un ciclo reproductivo. Aunque por otra parte, la dosis viral empleada en este experimento fue muy alta (62,000 DI). Es posible que bajo estas condiciones de infección, al igual que en los experimentos anteriores el sistema

de RNAi se haya visto abrumado por la cantidad de virus, por lo tanto el efecto quedó enmascarado. Otra posibilidad es que debido a las constantes condiciones de manejo y al extenso periodo de reproducción, los camarones hayan incrementado su susceptibilidad a otros patógenos, coadyuvando al efecto de WSSV.

Para determinar si el efecto antiviral se transmitió de los reproductores mencionados a la descendencia, se mantuvo a una muestra de la progenie hasta llegar a tres gr. Para determinar si los organismos de la generación F1 conservaron alguna resistencia contra el WSSV, se retaron contra el virus por vía intramuscular u oral.

Los camarones F1 de hembras tratadas y retados por vía intramuscular se murieron al mismo tiempo que lo camarones provenientes de hembras sin tratamiento. Al repetir este experimento e infectar por vía oral, la mortalidad fue muy similar en los camarones e incluso se murieron primero que los camarones provenientes de hembras sin tratamiento.

Con la experiencia de los experimentos anteriores, se puede especular sobre estos resultados en dos vertientes: (1) Si la descendencia lograra nacer con el silenciamiento de LvRab7 activo, tendría pocas posibilidades de sobrevivir. (2) Los camarones descendientes de hembras tratadas con dsRNA-LvRab7 no transmiten el efecto antiviral a la progenie y por lo tanto no se ve ningún efecto contra WSSV en los ensayos de reto. Aunque se determinó que el silenciamiento perdura en algunos tejidos, también se registró que la fertilidad se ve afectada, y se observó que el silenciamiento produce un deterioro en los animales. Dado que Rab7 está involucrada en el mecanismo de endocitosis y que la vitelogenina entra a los ovocitos por esta vía (Perevozchikov, 2008). Se puede inferir de manera no concluyente, que el efecto de silenciamiento provoca que algunos ovocitos no se desarrollen y por lo tanto, los animales que lograron desarrollarse no se vieron afectados por el silenciamiento. Además, la expresión de LvRab7 a varios días del silenciamiento mostró una pequeña oscilación en branquias y pleópodos. Estos resultados sugieren que el silenciamiento de un gen endógeno oscila durante el tiempo, dependiendo posiblemente de la cantidad de mRNAs presentes en la célula. Si se relaciona esta oscilación con la potencia del silenciamiento y con el efecto en el organismo, se explicaría porqué algunos huevos de camarón son viables y otros no y porqué la descendencia no adquirió resistencia contra WSSV.

Los resultados presentados anteriormente, son una contribución al entendimiento y aplicación del RNAi como una herramienta contra enfermedades virales en los laboratorios de producción de postlarvas de camarón.

Los camarones reproductores son la fuente de las postlarvas que se siembran en las granjas acuícolas de México. Garantizar la sanidad de los reproductores y de las postlarvas en una de las metas principales de los laboratorios de producción. Aunque las buenas prácticas de manejo en los laboratorios han reducido la incidencia de los brotes virales, hasta el momento no han sido suficientemente efectivas para eliminar a los patógenos. Por tal motivo, implementar el uso del RNAi en los laboratorios como una técnica preventiva y/o terapéutica podría mejorar la certificación de sanidad de la producción.

Es poco lo que se conoce sobre la duración del efecto antiviral producido por el silenciamiento de genes endógenos de camarón. Este es el primer estudio donde se observa que el bloqueo de LvRab7 produce un efecto potente y duradero contra el WSSV. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que el silenciamiento de este gen endógeno del camarón puede culminar con la muerte del organismo, si el silenciamiento progresa del knock down al knock out.

Por ello, es necesario realizar investigaciones adicionales para dilucidar las funciones de Rab7 en las células de los camarones antes de aplicar este tipo de estrategias a nivel productivo. Este trabajo muestra que el potencial de aplicación de la interferencia en la síntesis de proteínas relacionadas con infecciones virales mediante RNAi se encuentra en una paradoja; si se aplica orientado al silenciamiento de genes virales, éste es dependiente de la presencia del virus o de sus componentes; mientras que cuando se aplica orientado a genes endógenos el silenciamiento es progresivo y puede ser contraproducente si la interferencia disminuye la presencia de proteínas que tengan una función celular vital como el caso de LvRab7.

Este trabajo muestra que el potencial de aplicación de la interferencia en la síntesis de proteínas relacionadas con infecciones virales mediante RNAi se encuentra en una paradoja; si se aplica orientado al silenciamiento de genes virales, éste es dependiente de la presencia del virus o de sus componentes; mientras que cuando se aplica orientado a genes endógenos el silenciamiento es progresivo y puede ser contraproducente si la interferencia

disminuye la presencia de proteínas que tengan una función vital como lo sugiere los resultados de este estudio con LvRab7.

Una posible salida a esta paradoja es produciendo las proteínas de genes virales como VP28 de WSSV o endógenas como Rab7 para adicionarlas en el alimento. De acuerdo a estudios realizados al respecto, el suministro de proteínas virales recombinantes en el alimento podría obstruir los motivos de los receptores de membrana utilizados por el virus para internalizarse en la célula (Yi et al., 2004) o que estimulen la formación de fagosomas para clarificar al virus del ceno hemolifático en una infección secundaria (Fu et al., 2011). Por otra parte, recientemente se produjo PmRab7 recombinante en levadura (*Pichia pastoris*), con la finalidad de incluirla en el alimento y bloquear las proteínas virales. De esta manera, se espera impedir el anclaje del virus con los receptores de membrana. Aunque mostró gran afinidad a VP28 de WSSV y buena estabilidad después del proceso de liofilización, hasta el momento no ha sido probada *in vivo* contra el virus (Jupatanakul et al., 2011).

Otra estrategia que se ha explorado para extender el efecto antiviral contra WSSV es la producción de dsRNA mediante bacterias (*E. coli*) carentes de RNAsaIII transformadas con un plásmido que produce un mRNA con las secuencias sentido y antisentido de VP28 unidas, de tal manera que al sintetizar el mRNA, por complementariedad se pliega sobre si mismo con un tallo-asa formando dsRNA de VP28 (Sarathi et al., 2008). Esta metodología mostró resultados alentadores, sin embargo, la aplicación de *E. coli* en cualquier producto de consumo humano es inaceptable. En este sentido, recientemente se publicó la producción de VP28 recombinante mediante la transformación de un bacilo (*Bacillus subtilis*) que es parte de la flora bacteriana habitual del camarón (Fu et al., 2011). La ingestión de esporas del bacilo transformado indujo una protección baja en comparación a la aplicación directa de la proteína recombinante en ensayos de reto contra WSSV (Fu et al., 2011). Sin embargo, debido a la gran capacidad de los bacilos de secretar sustancias que refuerzan el sistema inmunológico de camarones (Tseng et al., 2009) y a la factibilidad de su transformación con plásmidos, podrían ser una herramienta poderosa para suministrar dsRNA contra WSSV a nivel comercial.

La utilidad del RNA de interferencia para contrarrestar infecciones virales en camarón todavía está en fase experimental. Es mucho el entendimiento alcanzable, antes de erradicar al virus de la mancha blanca o al menos mitigar su efecto. No obstante, mediante el uso de la tecnología más moderna en materia de ciencias biológicas y en comunicación, el conocimiento en esta área de la ciencia avanza a pasos agigantados.

En el presente estudio demostró que el silenciamiento de LvRab7 mediante dsRNA produce una potente respuesta antiviral que puede perdurar. Sin embargo, se sugiere que en algunos casos como con la proteína receptora de laminina (Lams) de *L. vannamei* y posiblemente LvRab7, este silenciamiento puede ser contraproducente. En conclusión, el silenciamiento de Rab7 como tratamiento preventivo o curativo hasta el momento no parece ser una medida adecuada contra WSSV. Sin embargo, los conocimientos adquiridos en este trabajo aportaron datos importantes acerca de cómo se comporta el silenciamiento de un gen endógeno de camarón, que a la postre contribuirán en el desarrollo de nuevas alternativas contra WSSV.

## Conclusiones

En el presente estudio se encontró un fragmento homólogo a Rab7 en reproductores de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) de México. La secuencia de nucleótidos tuvo >94% de similitud con las dos especies Asiáticas *Penaeus monodon* y *Marsupenaeus japonicus* y la secuencia de aminoácidos fue idéntica. Estos resultados indican que Rab7 es una proteína conservada entre especies de camarón.

La diferencia de tamaño de los fragmentos de dsRNA utilizados en este estudio, no fue lo suficiente grande para producir diferencias significativas en el efecto antiviral.

El silenciamiento de LvRab7 mediante dsRNA en reproductores de camarón inhibió los mRNA de LvRab7 y redujo la replicación de WSSV. Sin embargo, la reducción en la mortalidad fue baja cuando se infectó con 2500 DI y alta cuando se infectó con 25 DI. Por lo que se concluyó que grandes cantidades de virus pueden abrumar el mecanismo de RNAi cuando se bloquean genes endógenos.

El silenciamiento perdura al menos 21 días después de la aplicación del dsRNALvRab7 en branquias y pleópodos, no así en hemocitos donde la mayor inhibición se observó a los dos días pos aplicación de dsRNALvRab7.

Los resultados en este estudio indicaron que los organismos de la progenie F1 provenientes de hembras tratadas con dsRNA-LvRab7 no adquieren resistencia contra WSSV.



## Bibliografía

Álvarez-Ruiz P., Mejía-Ruiz C.H., Magallón-Barajas F.J., Escobedo-Bonilla C.M. 2012. Silencing Pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei* LvRab7 reduces mortality in brooders challenged with white spot syndrome virus. *Aquaculture Research*. 10.1111/j.1365-2109.2011.03084.x.

Assavalapsakul W., Smith D.R., Panyim S. 2006. Identification and characterization of a *Penaeus monodon* lymphoid cell-expressed receptor for the yellow head virus. *J Virol*. 80:262–269

Attasart P., Kaewkhaw R., Chimwai C., Kongphom U., Namramoon O., Panyim S. 2009. Inhibition of white spot syndrome virus replication in *Penaeus monodon* by combined silencing of viral rr2 and shrimp PmRab7. *Virus Research*, 145, 127-133.

Ayub F., Yusuf Sarker Md., Samsul Alam Md. 2008. Prevalence of white spot syndrome virus infection detected by one-step and nested PCR in selected tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hatcheries. *Aquacult Int*. 16:405–415

Bachmair A., Finley D., Varshavsky A. 1986. *In vivo* half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science*. 234(4773):179-186

Balasubramanian G., Sudhakaran R., Syed Musthaq S., Sarathi M., Sahul Hameed A.S. 2006. Studies on the inactivation of white spot syndrome virus of shrimp by physical and chemical treatments, and seaweed extracts tested in marine and freshwater animal models. *Journal of fish diseases*, 29: 569-572.

Bartel D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116: 281–297

Baulcombe D. 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356–363

Bocek A. 2004. *Introducción a la acuicultura*. International Center for Aquaculture  
Swingle Hall Auburn University, Alabama 36849-5419 USA

Bonami J.R., Brehelin M., Mari J., Trumper B., Lightner D.V. 1990. Purification and characterization of IHNV virus of penaeid shrimps. *J Gen Virol* 71: 2657-2664

Bonami, J.R., Hasson K.W., Mari J., Poulos B.T., Lightner D.V. 1997. Taura Syndrome of marine penaeid shrimp: characterization of the viral agent. *J Gen Virol* 78: 313-319.

Bucci C., Thomsen P., Nicoziani P., McCarthy J., van Deurs B. 2000. Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell*. 11:467-80

Chavier P., Parton R.G., Hauri H.P., Simons K., Zerial M. 1990. Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* 62:317-29.

Chazal N. y Gerlier D. 2003. Virus Entry, Assembly, Budding, and Membrane Rafts. *Microbiol Mol Biol Rev*. 67(2):226-237

Chou H.Y., Huang C.Y., Wang C.H., Chiang H.C., Lo C.F. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis Aquat Org* 23:165-173

Chu J.J. y Ng M.L. 2004. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J. Virol*. 78:10543-10555

Cedano-Tomas Y., Rosa-Vélez J. R., Bonami J.R., Vargas-Albores F. 2010. Gene expression Kinetics of the yellow head virus in experimentally infected *Litopenaeus vannamei*. *Aquac Research*. 41:1432-1443

Colpitts T.M., Moore A.C., Kolokoltsov A.A., Davey R.A. 2007. Venezuelan equine encephalitis virus infection of mosquito cells requires acidification as well as mosquito homologs of the endocytic proteins Rab5 and Rab7. *Virology*. 369: 78-91

Corbeel L. y Freson K. 2008. Rab proteins and Rab-associated proteins: major actors in the mechanism of protein-trafficking disorders. *European journal of pediatrics*, 167:723-729.

Dechklar M., Udomkit A., Panyim S. 2008. Characterization of argonaute cDNA from *Penaeus monodon* and implication of its role in RNA interference. *Biochem Biophys Res Commun*. 367:768–774

De Walt B. R. 2000. Social and environmental aspects of shrimp aquaculture in coastal Mexico. *Mangrove 200: Sustainable use of estuaries and mangroves: Challenges and prospects*. Recife, Brazil.

Ding S.W., Wu Q.F., Wang X.B. 2010. Viral suppressors of RNA-Based viral Immunity: host targets. *Cell Host Microbe*. 8: 12–15

Durand S., Lightner D.V., Nunan L.M., Redman R.M., Mari J., Bonami J.R. 1996. Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. *Dis Aquat Org* 27:59–66

Durand S., Lightner D.V., Redman R.M., Bonami J.R. 1997. Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus. *Dis Aquat Org*. 29:205-211

Dykxhoorn D.M., Novina C.D., Sharp P.A. 2003. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4(6): 457-67

Escobedo-Bonilla C.M., Wille M., Sanz V.A., Sorgeloos P., Pensaert M.B., Nauwynck H.J. 2005. *In vivo* titration of white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen-free

*Litopenaeus vannamei* by intramuscular and oral routes. *Dis Aquat Organ*, 66:163-170.

Escobedo-Bonilla, C.M., Alday-Sanz V., Wille M., Sorgelos P., Pensaert M.B., Nauwynck H.J. 2008. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *J. Fish Dis*, **31**, 1–18.

Esparza-Leal H.M., Escobedo-Bonilla C.M. Casillas-Hernández R, Álvarez-Ruiz P., Portillo-Clark G., Valerio-García R.C., Hernández-López J, Méndez-Lozano J, Vibanco-Pérez N, Magallón-Barajas F.J. 2009. Detection of white spot syndrome virus in filtered shrimp-farm water fractions and experimental evaluation of its infectivity in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*. 292: 16–22

FAO. Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura 2012. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO Roma, 2012

Feinberg E.H. y Hunter C.P. 2003. Transport of dsRNA into cell by the transmembrane protein SID-1. *Science*. 301:1545-1547

Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391: 806–811.

Flegel, T.W. 1997. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World J Microbiol Biotechnol*. 13: 433-442

Flegel, T.W., y V. Alday-Sanz. 1998. The crisis in Asian shrimp aquaculture: current status and future needs. *J Appl Ichthyol*. 14: 269-273

Fu L.L., Wang Y., Wu Z.C., Li W.F. 2011. *In vivo* assessment for oral delivery of *Bacillus subtilis* harboring a viral protein (VP28) against white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 322-323:33–38

Colbère-Garapin F., Blondel B., Saulnier A., Pelletier S, Labadie K. 2005. Silencing viruses by RNA interference. *Micobes and Infection* 7:767-775

Ganley I.G., Carroll K., Bittova L., Pfeffer S. 2004. Rab9 GTPase Regulates Late Endosome Size and Requires Effector Interaction for Its Stability. *Mol Biol Cell*. 15: 5420-5430

Goddard S. 1996. *Feed Management in Intensive Aquaculture*. Editorial Chapman & Hall. Primera edición. Newfoundland, Canada. 212p

Goldstein J.L., Brown M.S., Anderson R.G., Russell D.W., Schneider W.J. 1985. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu Rev Cell Biol*. 1: 1-39

Grishok A., Tabara H., Mello C.C. 2000. Genetic Requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *Science*. 287:2494-2497

Gui L., Wang B., Li F-H., Sun Y-M., Luo Z., Xiang a J-H., 2012. Blocking the large extracellular loop (LEL) domain of FcTetraspanin-3 could inhibit the infection of white spot syndrome virus (WSSV) in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish & Shellfish Immunology* 32 (2012) 1008e1015

Hammond S.H. 2005. Dicing and slicing The core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Letters* 579: 5822–5829

Haasnoot J.P.C., Cupac D., Berkhout B. 2003. Inhibition of Virus Replication by RNA Interference. *Journal of Biomedical Science*, 10:607-616

Hossain M.S., Khadijah S., Kwang J. 2004. Characterization of ORF89-A latency-related of white spot syndrome virus. *Virology*. 325:106-115

Huang C., Zhang L., Zhang J., Xiao L., Wu Q., Chen D., Li J.K. 2001. Purification and characterization of white spot syndrome virus (WSSV) produced in an alternate host: crayfish, *Cambarus clarkii* . *Virus Res* 76:115–125

Huang C., Zhang X., Lin Q., Xu X., Hu Z., Hew C.L. 2002. Proteomic analysis of shrimp white spot syndrome viral proteins and characterization of a novel envelope protein VP466. *Mol Cell Proteomics* 1:223–231

Huynh T.G., Yeh S.T., Lin Y.Ch., Shyu J.F., Chen L.L. & Chen J.Ch. 2011. White shrimp *Litopenaeus vannamei* immersed in seawater containing *Sargassum hemiphyllum* var. *Chinese powder* and its extract showed increased immunity and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology*. 31: 286-293

Inouye, K., S. Miwa, N. Oseko, H. Nakano, T. Kimura, K. Momoyama, M. Hiraoka 1994. Mass mortalities of cultured Kuruma Shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: Electron Microscopic evidence of the Causative Virus. *Fish Pathology*. 29(2): 148-158.

Jiang L., Wei C.H., Li Y. 2012. Viral suppression of RNA silencing. *Sci China Life Sci*, 55: 109–118

Jupatanakul N., Wannapapho W., Eurwilaichitr L., Flegel T.W., Sritunyaluksana K. 2011. Cloning and expression of recombinant shrimp PmRab7 (a virus-binding protein) in *Pichia pastoris*. *Prot Exp Purif*. 76:1–6

Khadijah S., Neo S.Y., Hossain M.S., Miller L.D., Mathavan S., Kwang J. 2003. Identification of white spot syndrome virus latency-related genes in specific-pathogen-free shrimps by use of a microarray. *J Virol.* 77:10162–10167

Kim C.S., Kosuke Z., Nam Y.K., Kim S.K., Kim K.H. 2007. Protection of shrimp (*Penaeus chinensis*) against white spot syndrome virus (WSSV) challenge by double-stranded RNA. *Fish & Shellfish Immunol.* 23:242–246

Lan Y., Lu W., Xu X. 2002. Genomic instability of prawn white spot bacilliform virus (WSBV) and its association to virus virulence. *Virus Res.* 90:269–274

Lebreuche Y., O’Leary N. A., de la Vega E., Veloso A., Gross P.S., Chapman R.W., Browdy C.L. & Warr G.W. 2009. Lack of evidence for *Litopenaeus vannamei* Toll receptor (IToll) involvement in activation of sequence-independent antiviral immunity in shrimp. *Dev Com Immunol.* 33:806-810

Lee R.C., Feinbaum, R.L., Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843–854

Leu J.H., Tsai J.M., Wang H.C., Wang A.H., Wang C.H., Kou G.H., Lo C.F. 2005. The unique stacked rings in the nucleocapsid of the white spot syndrome virus virion are formed by the major structural protein VP664, the largest viral structural protein ever found. *J Virol* 79:140–149

Leu J.H., Yang F., Zhang X., Xu X., Kou G.H., Lo C.F. 2009. Whispovirus. *Curr Top Microbiol Immunol.* 328: 197-227

Leu, J.H. y Lo C.F. 2011. A review of the strategies evolved by WSSV to thwart host responses to infection and ensure successful virus replication in cells - apoptosis and anti-apoptosis strategies. pp. 135-144. *In* Bondad-Reantaso, M.G., Jones, J.B., Corsin, F. and

Aoki, T. (eds.). Diseases in Asian Aquaculture VII. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia. 385 pp.

Li L., Lin S., Yang F. 2006. Characterization of an envelope protein (VP110) of white spot syndrome virus. *J Gen Virol* 87:1909–1915

Li D.F., Zhang M.C., Yang H.J., Zhu Y.B., Xu X. 2007. Beta-integrin mediates WSSV infection. *Virology*. 368:122–132

Li F. y Xiang J. 2012 Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China. *Dev Com Immunol* (en Prensa)

Lightner D.V. 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, 305 pp.

Lightner D.V. y Redman R.M. 1998. Strategies for the control of viral diseases of shrimp in the Americas. *Fish Pathology*. 33(4): 165-180

Lightner D.V. 1999. The penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV, and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies. *J. Appl. Aquaculture*. 9: 27-52.

Lightner D.V., Pantoja C.R., Poulos B.T., Tang K.F.J., Redman R.M., Andreas T., Bonami J.R. 2004. Infectious Myonecrosis (IMN): a New Virus Disease of *Litopenaeus vannamei*. Book of Abstracts. World Aquaculture 2004, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.



Lightner D.V. 2005. Biosecurity in Shrimp Farming: Pathogen Exclusion through Use of SPF Stock and Routine Surveillance. *Journal of The World Aquaculture Society*. 36(3): 229-248

Lightner D.V. 2011. Virus diseases of farmed shrimp in the western Hemisphere (the Americas): A review. *J Invertebr Pathol*. 106: 110-130

Lipardi C. y Paterson B.M. 2010. Identification of an RNA-dependent RNA polymerase in *Drosophila* establishes a common theme in RNA silencing. *Fly* 4(1): 30-35

Liu W.J., Chang Y.S., Wang C.H., Kou G.H., Lo C.F. 2005. Microarray and RT-PCR screening for white spot syndrome virus immediate-early genes in cycloheximide-treated shrimp. *Virology*. 334:327–341

Llera-Herrera R., García-Gasca A., Huvet A. & Ibarra A.M. 2012. Identification of a *tubulin- $\alpha$*  gene specifically expressed in testis and adductor muscle during stable reference gene selection in the hermaphrodite gonad of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Marine Genomics* in press

Lo C.F., Ho C.H., Peng S.E., Chen C.H., Hsu H.C., Chiu Y.L., Chang C.F., Liu K.F., Su M.S., Wang C.H., Kou G.H. 1996. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimps, crabs and other arthropods. *Dis Aquat Org* 27:215–225

Lo C.F., Ho C.H., Chen C.H., Liu K.F., Chiu Y.L., Yeh P.Y., Peng S.E., Hsu H.E., Liu H.C., Chang C.F., Su M.S., Wang C.H., Kou G.H. 1997. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Dis Aquat Org*. 30:53–72

Lotz J.M. 1997. Special topic review: Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stock in shrimp aquaculture. *World J Microbiol & Biotechnol*. 13: 405-413

Manna D., Aligo J., Xu C., Park W.S., Koc H., Heo W.D., Konan K. V. 2010. Endocytic Rab proteins are required for hepatitis C virus replication complex formation. *Virology* 398: 21-37

Markgraf, D. F., Peplowska, K., Ungerman, C. 2007. Rab cascades and tethering factors in the endomembrane system. *FEBS Lett.* 58:, 2125-2130

Mejía-Ruiz C.H., Vega-Peña S., Álvarez-Ruiz P., Escobedo-Bonilla C.M. 2011. Double-stranded RNA against white spot syndrome virus (WSSV) vp28 or vp26 reduced susceptibility of *Litopenaeus vannamei* to WSSV, and survivors exhibited decreased susceptibility in subsequent re-infections. *Journal of Invertebrate Pathology* 107: 65-68.

Meresse S., Gorvel J.P., Chavrier P. 1995. The Rab7 GTPase resides on a vesicular compartment connected to lysosomes. *J Cell Sci.* 108:3349-58.

Morales-Covarrubias M.S. y Chavez-Sanchez M.C. 1999. Histopathological studies on wild broodstock of white shrimp *Penaeus vannamei* in the Platanitos area, adjacent to San Blas, Nayarit, Mexico. *J World Aquaculture Soc.* 30: 192-200.

Musiri P., Boyd C. E., Teichert-Coddington D., Hajek B. F. 1996. Texture and chemical composition of soils from shrimp ponds near Choluteda, Honduras. *Aquaculture International.* 4: 157-168

Ongvarrasopone C., Chanasakulniyom M., Sritunyalucksana K., Panyim S. 2008. Suppression of PmRab7 by dsRNA inhibits WSSV or YHV infection in shrimp. *Marine biotechnology.* 10: 374-381.

Ongvarrasopone C., Chomchay E., Panyim S. 2010. Antiviral effect of PmRab7 knock-down in inhibition of Leam-Singh virus replication in black tiger shrimp. *Antiviral Research.* 88: 116-118.

Ongvarrasopone Ch., Saejia P., Chanasakulniyom M., Panyim S. 2011. Inhibition of Taura syndrome virus replication in *Litopenaeus vannemi* through silencing the LvRab7 gene using double-stranded RNA. Arch Virol 156: 1117-1123.

Páez Osuna F. 2001 Camaronicultura y Medio Ambiente. Editorial. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Primera edición. 452p

Peinado-Guevara L. I. y López-Meyer M. 2006. Detailed monitoring of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp commercial ponds in Sinaloa, Mexico by nested PCR. Aquaculture. 251: 33– 45

Peraza-Gómez V., Luna-González A., Campa-Córdova A., López-Meyer M., Fierro-Coronado A., Alvarez-Ruiz P. 2009. Probiotic microorganisms and antiviral plants reduce mortality and prevalence of WSSV in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured under laboratory conditions. Aquaculture Research, 40, 1481-1489.

Perevozchikov A.P. 2008. Sterols and Their Transport in Animal Development. Russian J Dev Biol. 39(3):131–150.

Pillay T.V.R. Aquaculture and the environment 2004. Editorial Willey-Blackwell. Segunda edición. New Jersey, U.S.A. 208 p

Pramod Kiran R.B., Rajendran K.V., Jung S.J., Oh M.J. 2002. Experimental susceptibility of different life-stages of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), to white spot syndrome virus (WSSV). J Fish Dis 25:201–207

Posiri P., Ongvarrasopone Ch., Panyim S. 2011. Improved preventive and curative effects of YHV infection in *Penaeus monodon* by a combination of two double stranded RNAs. Aquaculture 314: 34-38

Radtke K., Dohner K., Sodeik B. 2006. Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell. *Cell Microbiol.* 8:387–400

Rahman M.M., Escobedo-Bonilla C.M., Wille M., Alday Sanz V., Audoorn L., Neyts J., Pensaert M.B., Sorgeloos P., Nauwynck H.J. 2006a. Clinical effect of cidofovir and a diet supplemented with *Spirulina platensis* in white spot syndrome virus (WSSV) infected specific pathogen-free *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture.* 255: 600-605.

Rahman M.M., Escobedo-Bonilla C.M., Corteel M., Dantas-Lima J.J., Wille M., Alday-Sanz V., Pensaert M.B., Sorgeloos P., Nauwynck H.J. 2006b. Effect of high water temperature (33 °C) on the clinical and virological outcome of experimental infections with white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen-free (SPF) *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture.* 261: 842-849.

Ramirez Douriet C.M. 2005. Detección Molecular del virus de la Mancha Blanca(WSSV) En el Zooplancton del Sistema Lagunar San Ignacio-Navachiste-Macapule y en estanques de cultivo de camarón. Tesis de maestría. CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa.

Reed L.J. y Muench H. 1938. A simple method of estimating 50 per cent end-points. *Am J Hyg* 27:493–497

Rijiravanich A., Browdy C.L., Withyachumnarnkul B. 2008. Knocking down caspase-3 by RNAi reduces mortality in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* challenged with a low dose of white-spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology.* 24: 308-313.

Robalino J., Browdy C.L., Prior S., Metz A., Parnell P., Gross P., Warr G. 2004. Induction of Antiviral Immunity by Double-Stranded RNA in a Marine Invertebrate. *J Virology.* 78(19):10442-10448

Robalino J., Bartlett T., Shepard E.F., Prior S., Jaramillo G., Scura E., Chapman R.W., Gross P.S., Browdy C. L., Warr G.W. 2005. Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to non-specific immunity in marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response?. *Journal of virology*. 79: 13561-13571.

Sánchez-Barajas M., Liñan-Cabello M.a., Mena-Herrera A. 2009. Detection of yellow-head disease in intensive freshwater production systems of *Litopenaeus vannamei* *Aquacult Int.* 7:101–112

Sarathi M., Simon M.C., Ahmed V.P., Kumar S.R., Hameed A.S. 2008a. Silencing VP28 gene of white spot syndrome virus of shrimp by bacterially expressed dsRNA. *Mar Biotechnol.* 10:198–206

Sarathi M., Simon M.C., Venkatesan C., Hameed A.S. 2008b. Oral administration of bacterially expressed VP28dsRNA to protect *Penaeus monodon* from white spot syndrome virus. *Mar Biotechnol.* 10:242–249

Sarathi M., Simon M.C., Venkatesan C., Thomas J., Ravi M, Madan N., Thiyagarajan S., Sahul Hameed S.A. 2010. Efficacy of bacterially expressed dsRNA specific to different structural genes of white spot syndrome virus (WSSV) in protection of shrimp from WSSV infection. *Fish Pathology.* 33(7):603-607

Savitsky M., Kwon D., Georgiev P., Kalmykova A., Gvozdev V. 2006. Telomere elongation is under the control of the RNAi-based mechanism. *Genes Dev.* 20:345-354

Schonbaum C.P., Perrino J.J., Mahowald A.P. 2000. Regulation of the Vitellogenin Receptor during *Drosophila melanogaster* Oogenesis. *Mol Biol of the Cell.* 11:511-521

Schuur A.M. 2003. Evaluation of biosecurity applications for intensive shrimp farming. *Aquacultural Engineering*. 28: 3-20

Senapin S., Phiwsaiya L., Anantasomboon G., Sriphaijit T., Browdy C.L., Flegel T.W. 2010. Knocking down a Taura syndrome virus (TSV) binding protein Lamr is lethal for the whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*. 29:422-429

Seabra M.C. y Wasmeier C. 2004. Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Curr Opin Cell Biol*. 16:451-7

Shekhar M.S. y Lu Y. 2009. Application of Nucleic-acid-based Therapeutics for Viral Infections in Shrimp Aquaculture. *Marine Biotechnology*. 11: 1-9

Shih J.D., Fitzgerald M.C., Sutherlin M., Hunter C.P. 2009. The SID-1 double-stranded RNA transporter is not selective for dsRNA length. *RNA* 15: 384–390

Sieczkarski S.B. y Whittaker G.R. 2002. Dissecting virus entry via endocytosis. *Journal of virology*. 83:1535-1545

Sijen T., Steiner F.A., Thijssen K.L., Plasterk R.H.A. 2007. Secondary siRNAs Result from Unprimed RNA Synthesis and Form a Distinct Class. *Science* 315: 244-247.

Siomi H. y Siomi M.C. 2009. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*. 457:396-404

Sodeik B 2000. Review: Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. *Trends in Microbiology*, 8: 465-472

Rodman S.J. y Wandinger-Ness A. 2000. Rab GTPases coordinate endocytosis *Journal of Cell Science*. 113: 183-192

Sritunyalucksana K., Wannapapho W., Lo C.F., Flegel T.W. 2006. PmRab7 is a VP28-binding protein involved in white spot syndrome virus infection in shrimp. *Journal of virology*. 80: 10734-10742.

Stenmark H. y Olkkonen V.M. 2001. The Rab GTPase family. *Genome Biol*. 2:3007

Su J., Oanh D.T., Lyons R.E., Leeton L., Van Hulten M.C., Tan S.H., Song L., Rajendran K.V., Walker P.J. 2008. A key gene of the RNA interference pathway in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*: identification and functional characterisation of Dicer-1. *Fish Shellfish Immunol*. 24:223–233

Sudhakaran R., Mekata T., Kono T., Inada M., Okugawa S., Yoshimine M., Yoshida T., Sakai M., Itami T. 2011. Double-stranded RNA-mediated silencing of the white spot syndrome virus VP28 gene in kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture Research*. 42: 1153-1162

Sun X., Yau V.K., Briggs B.J., Whittaker G.R. 2005. Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology* 338: 53-60

Tirasophon W., Roshorn Y., Panyim S. 2005. Silencing of yellow head virus replication in penaeid shrimp cells by dsRNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 334:102–107

Tirasophon W., Yodmuang S., Chinnirunvong W., Plongthongkum N., Panyim S. 2007. Therapeutic inhibition of yellow head virus multiplication in infected shrimps by YHV-protease dsRNA. *Antiviral Res*. 74:150–155

Tiu S.H.K., Benzie J., Chan S.M. 2008. From Hepatopancreas to Ovary: Molecular Characterization of a Shrimp Vitellogenin Receptor Involved in the Processing of Vitellogenin. *Biology of Reproduction* 79: 66–74

Treerattrakool S., Panyim S., Chan S.M., Withyachumnarnkul B., Udomkit A. 2008. Molecular characterization of gonad-inhibiting hormone of *Penaeus monodon* and elucidation of its inhibitory role in vitellogenin expression by RNA interference. *FEBS J.* 275:970–980

Tsai J.M., Wang H.C., Leu J.H., Hsiao H.H., Wang A.H., Kou G.H., Lo C.F. 2004. Genomic and proteomic analysis of thirty-nine structural proteins of shrimp white spot syndrome virus. *J Virol.* 78:11360–11370

Tseng D.Y., Ho P.L., Huang S.Y., Cheng S.C., Shiu Y.L., Chiu C.S., Liu C.H. 2009. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish Shellfish Immunol.* 26: 339–344.

Van der Sluijs P. y Gerez L. 1999. Rab GTPases as regulator of transport through endosomes. *Protoplasma* 210:1-10

van der Schaar H.M., Rust M.J., Chen C., van der Ende-Metselaar H., Wilschut J., Zhuang X., Smit J.M. 2008. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathog.* 4: 1-9

van Hulten M.C., Goldbach R.W., Vlak J.M. 2000a. Three functionally diverged major structural proteins of white spot syndrome virus evolved by gene duplication. *J Gen Virol.* 81:2525–2529

van Hulten M.C., Westenberg M., Goodall S.D., Vlak J.M. 2000b. Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. *Virology.* 266:227–236



van Hulten M.C., Witteveldt J., Peters S., Kloosterboer N., Tarchini R., Fiers M., Sandbrink H., Lankhorst R.K., Vlak J.M. 2001a. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology*. 286:7–22

van Hulten M.C., Witteveldt J., Snippe M., Vlak J.M. 2001b. White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. *Virology*. 285:228–233

van Hulten M.C., Reijns M., Vermeesch A.M., Zandbergen F., Vlak J.M. 2002. Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins. *J Gen Virol* 83:257–265

Venegas C.A., Nonaka L., Mushiake K., Shimizu K., Nishizawa T., Muroga K. 1999. Pathogenicity of penaeid rod-shaped DNA virus PRDV to Kuruma prawn in different development stages. *Fish Pathol* 34:19–23

Vitelli R., Santillo M., Lattero D., Chiariello M., Bifulco M., Bruni C.B. 1997. Role of the small GTPase Rab7 in the late endocytic pathway. *J Biol Chem*. 272:4391-7

Wang C.H., Lo C.F., Leu J.H., Chou C.M., Yeh P.Y., Chou H.Y., Tung M.C., Chang C.F., Su M.S., Kou G.H. 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org* 23:239–242

Wang Z., Hu L., Yi G., Xu H., Qi Y., Yao L. 2004. ORF390 of white spot syndrome virus genome is identified as a novel anti-apoptosis gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 325:899–907

Wang L., Zhi B., Wu W., Zhang X. 2008. Requirement for shrimp caspase in apoptosis against virus infection. *Dev Comp Immunol*. 32:706–715

Wang W. y Zhang X. 2008. Comparison of antiviral efficiency of immune responses in shrimp. *Fish Shellfish Immunol.* 25: 522–527

Westenberg M., Heinhuis B., Zuidema D., Vlak J.M. 2005. siRNA injection induces sequence-independent protection in *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus. *Virus Res* 114:133–139

Wightman B., Ha I., Ruvkun G. 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell.* 75: 855–862.

Winston W.M., Molodwitch C., Hunter C.P. 2002. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science.* 295:2456-2459

Witteveldt J., Vlak J.M., van Hulten M.C. 2004. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine. *Fish Shellfish Immunol*, 16: 571-579

Wongprasert K., Khanobdee K., Glunukarn S.S., Meeratana P., Withyachumnarnkul B. 2003. Timecourse and levels of apoptosis in various tissues of black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white-spot syndrome virus. *Dis Aquat Org* 55:3–10

Wongteerasupaya, C., J.E. Vickers, S. Sriuiratana, G.L. Nash, A. Akarajamorn, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul, T.W. Flegel 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org* 21:69–77

Wu Y., Lü L., Yang L.S., Weng S.P., Chan S.M., He J.G. 2007. Inhibition of white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei* shrimp by sequence-specific siRNA. *Aquaculture.* 271:21–30

Wu W., Zong R., Xu J., Zhang X. 2008. Antiviral phagocytosis is regulated by a novel Rab-dependent complex in shrimp *Penaeus japonicus*. *J Proteome Res* 7:424–431

Wu W. y Zhang X. 2007. Characterization of a Rab GTPase up-regulated in the shrimp *Penaeus japonicus* by virus infection. *Fish Shellfish Immunol* 23: 438-445

Xie X. y Yang F. 2005. Interaction of white spot syndrome virus VP26 protein with actin. *Virology*. 336:93–99

Xie X., Xu L., Yang F. 2006. Proteomic analysis of the major envelope and nucleocapsid proteins of white spot syndrome virus. *J Virol*. 80:10615–10623

Chazal N. y Gerlier D. 2003. Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiol Mol Biol Rev*. 67:226–237

Xu J., Han F., Zhang X. 2007a. Silencing shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes by siRNA. *Antiviral Res*. 73:126–131

Xu J., Wu S., Zhang X. 2008. Novel function of QM protein of shrimp (*Penaeus japonicus*) in regulation of phenol oxidase activity by interaction with hemocyanin. *Cell Physiol Biochem*. 21:473–480

Yan F., Xia D., Hu J., Yuan H., Zou T., Zhou Q., Liang L., Qi Y., Xu H. 2010. Heat shock cognate protein 70 gene is required for prevention of apoptosis induced by WSSV infection. *Arch Virol*. 155:1077–1083

Yang F., He J., Lin X., Li Q., Pan D., Zhang X., Xu X. 2001. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *J Virol* 75:11811–11820

Yang B., Song X.L., Huang J., Shi C.Y., Liu Q.H., Liu L. 2006. A single-step multiplex PCR for simultaneous detection of white spot syndrome virus and infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. *J Fish Dis.* 29: 301–305

Yano I. 1985. Induced ovarian maturation and spawning in greasyback shrimp *Metapenaeus ensis*, by progesterone. *Aquaculture.* 47:223-229

Yano I. 1987. Effect of 17 $\alpha$ -OH-progesterone on vitellogenin secretion in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture.* 61:46-57

Ye (a) T., Zong R., Zhang X. 2012. The role of white spot syndrome virus (WSSV) VP466 protein in shrimp antiviral phagocytosis. *Fish & Shellfish Immunol.* 33: 350-358

Ye(b) T., Tang W., Zhang X. J. 2012. Involvement of Rab6 in the Regulation of Phagocytosis against Virus Infection in Invertebrates. *Proteome Res.* 11: 4834–4846

Yi G., Wang Z., Qi Y., Yao L, Qian J., Hu L. 2004. Vp28 of Shrimp White Spot Syndrome Virus Is Involved in the Attachment and Penetration into Shrimp Cells. *J Biochem Mol Biol.* 37(6):726-734

Yodmuang S., Tirasophon W., Roshorn Y., Chinnirunvong W., Panyim S. 2006. YHV-protease dsRNA inhibits YHV replication in *Penaeus monodon* and prevents mortality. *Biochem Biophys Res Commun.* 341:351–356

Yoganandhan K., Sathish S., Murugan V., Narayanan R.B. , Sahul Hameed A.S. 2003. Screening the organs for early detection of white spot syndrome virus in *Penaeus indicus* by histopathology and PCR techniques. *Aquaculture* 215: 21–29

Zhang X., Xu X., Hew C.L. 2001. The structure and function of a gene encoding a basic peptide from prawn white spot syndrome virus. *Virus Res* 79:137–144

Zhang X., Huang C., Tang X., Zhuang Y., Hew C.L. 2004. Identification of structural proteins from shrimp white spot syndrome virus (WSSV) by 2DE-MS. *Proteins* 55:229–235

Zhao C., Slevin J.T., Whiteheart S.W. 2007. Cellular functions of NSF: not just SNAPs and SNAREs. *FEBS Lett.* 581:2140-9

Zhu Y., Ding Q., Yang F. 2007. Characterization of a homologous-region-binding protein from white spot syndrome virus by phage display. *Virus Res* 125:145–152

Zong R., Wu W., Xu J., Zhang X. 2008. Regulation of phagocytosis against bacterium by Rab GTPase in shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol* 25:258–263

**ANEXOS**