



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias Del Mar

**“SILENCIAMIENTO DE POSIBLES GENES ANTIVIRALES
EN *Litopenaeus vannamei* Y SU EFECTO EN LA
SUSCEPTIBILIDAD AL VIRUS DEL SÍNDROME DE LA
MANCHA BLANCA (WSSV)”**

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del título de:

INGENIERO ACUICULTOR

Presentado por:

AIDA BEATRIZ MORAN CASTILLO

MARIUXI JACQUELINE MIRABA GUERRERO

GUAYAQUIL - ECUADOR

2010

AGRADECIMIENTO

Queremos hacer extensivas nuestros agradecimientos:

A Dios por bendecirnos y proveernos de fortaleza, constancia en el desarrollo de este trabajo, por brindarnos una vida llena de aprendizajes y experiencias en el transcurso de nuestra carrera.

A nuestros padres que nos dieron la vida, por darnos una carrera para nuestro futuro y porque siempre nos han brindado todo su apoyo y amor incondicional día a día, gracias por ser un excelente ejemplo de vida a seguir.

Al PhD. Javier Robalino quien nos supo dirigir con paciencia, confianza y por compartir sus conocimientos durante el proceso de nuestro trabajo.

A nuestros profesores por confiar en nosotras y tener la paciencia necesaria: Ph.D Marcelo Muñoz. Ph.D Washington Cárdenas, M.Sc. Jerry Landívar, M.Sc. Ecuador Marcillo, M.Sc Sonia Guartatanga y de mas profesores de la Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias Del Mar.

A la Universidad Medica de Carolina del Sur - MUSC (Marine Biomedicine and Environmental Sciences Center) por el financiamiento de esta tesis.

Al Ing. Walter Intriago por habernos dado la oportunidad de desarrollar la tesis en sus instalaciones, por el apoyo y facilidades que nos fueron concedidos en la empresa BIOGEMAR S.A.

Al M.Sc. Ricardo Cedeño por su colaboración y disposición en la parte experimental de la tesis.

A todos nuestros compañeros y amigos con quienes hemos compartido momentos felices y tristes en nuestra carrera universitaria.

DEDICATORIA

A mis padres:

Aida Castillo y Alvaro Moran

A mis hermanos:

Jessica, Alvaro y Katty

A mis Amigos:

Carlos Sampedro y

Jonathan Castro

Aida Beatriz Morán Castillo

DEDICATORIA

A mis padres

A mi hermana Karina

A mi abuelita y toda mi familia

A mis amigos Jonathan,

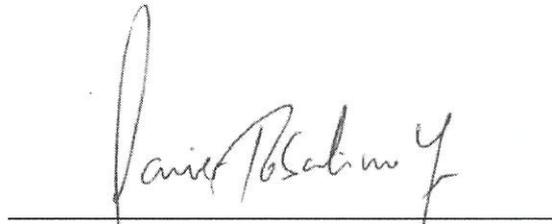
Ricardo y Carlos

Mariuxi Jacqueline Mirabá Guerrero

TRIBUNAL DE GRADUACION



M.Sc. Jerry Landívar Z.
PRESIDENTE



Ph.D. Javier Robalino I.
DIRECTOR DE TESIS



Ph.D. Marcelo Muñoz N.
CO-DIRECTOR



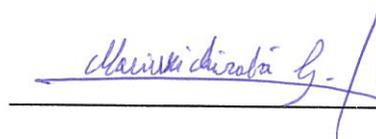
Ph.D. Washington Cárdenas
VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestas en esta tesis, corresponden exclusivamente a sus autoras; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”



Aida Morán Castillo



Mariuxi Mirabá Guerrero

RESUMEN

Enfermedades virales como el Síndrome de la Mancha Blanca, causado por el virus de la Mancha Blanca (WSSV, siglas en inglés) afectan significativamente a la industria camaronera. El conocimiento de las bases genéticas y moleculares del sistema inmunitario antiviral del camarón es importante para desarrollar estrategias de control, basadas en profilaxis y mejoramiento genético. Investigaciones han demostrado que la maquinaria de ARN de interferencia (ARNi) está presente en camarones peneidos como el *Litopenaeus vannamei* y que genes endógenos pueden ser silenciados específicamente mediante la inyección de ARN de doble cadena (dsRNA, siglas en inglés).

Fueron evaluados 54 genes candidatos en un sistema de infección experimental en donde la susceptibilidad al WSSV fue cuantificada. El proceso consistió en inyectar a grupos de animales con dsRNA diseñados para reducir la expresión de cada gen (*i.e.*, a través del mecanismo de ARNi). Posteriormente los animales fueron desafiados con dosis de WSSV calibradas para causar 60-80% de mortalidad en grupos control.

En los resultados se obtuvieron un 41% de genes evaluados que presentaron reducción en su expresión, que resultó en una significativa letalidad, independientemente de si los animales fueron o no infectados experimentalmente con WSSV (*i.e.*, genes esenciales para la supervivencia del camarón) por lo tanto su posible rol en la respuesta antiviral no pudo ser determinada. El 58% de los genes restantes, aparentemente no esenciales, no se encontraron asociados con una respuesta antiviral deficiente.

Sin embargo se detectó un fenotipo de potencial interés, un gen que posiblemente el virus necesita para replicarse y/o producir enfermedad. Estudios futuros serán necesarios para comprobar el fenotipo observado en este trabajo, y para determinar el posible rol de este gen en la interacción entre WSSV y el hospedero.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	II
ÍNDICE GENERAL.....	V
ABREVIATURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPITULO 1

1. ANTECEDENTES.....	5
1.1 White Spot Syndrome Virus (WSSV).....	7
1.1.1. Descripción de la enfermedad.....	7
1.1.2. Biología Molecular del Virus.....	8
1.1.3. Epidemiología del Virus.....	11
1.1.3.1 Especies afectadas.....	11
1.1.3.2 Transmisión.....	12
1.1.3.3 Fuentes del Virus.....	12
1.1.3.4 Distribución Geográfica.....	13

1.2 ARN de doble cadena(dsRNA) y respuestas antivirales independientes de RNAi.....	14
1.2.1 Respuestas antivirales innatas inducidas por dsRNA en Vertebrados.....	14
1.2.2 Respuestas antivirales inducidas por dsRNA en Invertebrados.....	16
1.3 ARN de interferencia (RNAi).....	18
1.4 ARN de interferencia en Crustáceos.....	20

CAPITULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
2.1.Preparación de Sustratos para la Síntesis de dsRNA.	22
2.2.Preparación de ARN de doble cadena (dsRNA).....	24
2.3.Levantamiento de animales experimentales a partir de larvas.....	26
2.4. Infecciones Experimentales.....	27
2.5. Bioinformática.....	30
2.6. Análisis Estadístico.....	31

CAPITULO 3

3. RESULTADOS.....	34
3.1 Resultados preliminares.....	34
3.1.1 Selección de 54 genes candidatos en base a estudios de expresión genética a gran escala.....	34
3.1.2 Implementación de un sistema de infección experimental individual.....	35
3.2 Análisis Bioinformático de genes candidatos.....	38
3.3 Fenotipos asociados con genes candidatos en animales desafiados con WSSV.....	43

CAPITULO 4

4. DISCUSIÓN.....	54
Conclusiones.....	61
Recomendaciones.....	62
Anexos	
Bibliografía	

ABREVIATURAS

a.a.	Aminoácido	KCl	Cloruro de potasio
ADN	Acido desoxirribonucleico	L.	Litopenaeus
ADNc	Acido ribonucleico complementario	MDA5	Gen asociado a la diferenciación de melanoma 5
Ago	Argonauta	MgCl₂	Cloruro de magnesio
ARN	Acido ribonucleico	ml	mililitro
ARNm	Acido ribonucleico mensajero	mM	milimolar
ARNi	Acido ribonucleico de interferencia	MPM	Marcador de Peso Molecular
BLAST	Basic Local Aligment Search Tools	NaCl	Cloruro de Sodio
BP	Baculovirus Pernei	NCBI	National Center for Biotechnology Information
dsRNA	Acido ribonucleico de doble cadena	NTPs	ribo nucleótidos
CENAIM	Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas	°C	Grados centígrados
DNasa	Desoxirribonucleasa	ORF	Marco abierto de lectura
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfato	PAMPs	Patrones Moleculares asociados a Patógenos
DTT	Dithiothreitol	pb	Pares de Bases
EST	Etiquetas de secuencias expresadas	PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
EXPASY	Expert Protein Analysis System	PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
g.	Gramos	pH	Potencial de hidrógeno
HCl	Acido clorhídrico	ppm	Partes por millón
IFN	Interferón	ppt	Partes por mil
IHHNV	Virus de la necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa	ProPO	Pro-Fenol Oxidasa
IMNV	Virus de la Mionecrosis Infecciosa	PRRs	Pattern Recognition Receptors/Receptores de reconocimiento de patrones
		rATP	ribonucleótido Adenosine-5'-Triphosphate

rCTP	ribonucleótido Cytidine 5'- Triphosphate
RGD	arginina (R), glicina (G), y aspartato (D).
rGTP	ribonucleótido Guanosine- 5'- Triphosphate
RIG1	Gen inducible por ácido retinoico 1
RISC	Complejo de silenciamiento proteico de RNA
RNAsin	Inhibidor de ribonucleasa
RPM	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa
rUTP	ribonucleótido Uridine- 5'-Triphosphate
siRNA	ARN de interferencia corto
TLR	Toll-like receptors
TSV	Virus del Síndrome de Taura
U.	Unidades
VP	Proteína viral
WSD	Enfermedad de la Mancha Blanca
WSSV	Virus del Síndrome de la Mancha Blanca
X²	Chi cuadrado
µg	microgramo
µl	microlitro
µm	micrómetro

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla i. Dominios funcionales de 54 genes evaluados.....	40
Tabla ii. Fenotipos observados en 54 genes evaluados.....	48
Tabla iii. Análisis Bioinformático de 54 genes evaluados.....	Anexo D

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Exportaciones Ecuatorianas de Camarón.....	7
Figura 2. Esquema General del Silenciamiento por medio de ARN de interferencia.	19
Figura 3. Gel de Agarosa con productos obtenidos de transcripción, hibridación y amplificación para obtención de sustrato.....	25
Figura 4. Sistemas de desafíos individuales.....	29
Figura 5. Modelo aplicado para el análisis en tablas de contingencias.....	32
Figura 6. Determinación de dosis de WSSV óptimas para la evaluación del efecto de bloqueo genético sobre la susceptibilidad a WSSV.....	37
Figura 7. Diagrama de flujo del análisis Bioinformático realizado para cada uno de los genes evaluados.	39
Figura 8. Cuatro fenotipos predecibles en ensayos de susceptibilidad con WSSV.....	44
Figura 9. Diagrama de flujo del análisis estadístico aplicado para determinar los fenotipos de cada uno de los 54 genes evaluados.....	45

INTRODUCCION.

Las zonas costeras de Ecuador representan una de las áreas de mayor producción de camarón blanco *L. vannamei*. Uno de los problemas de mayor impacto para el cultivo de camarón en el país durante los últimos años ha sido el Síndrome de la Mancha Blanca, causado por el virus que lleva el mismo nombre (*i.e.*, WSSV) (Calderón *et al.*, 1999; Alday de Graindorge & Griffith, 2000). Esta enfermedad puede ocasionar mortalidad de hasta el 100% en los sistemas de producción (Sahul *et al.*, 2001) y, hasta la fecha, existen pocas estrategias eficaces para mitigar su impacto en los sistemas de producción.

El ARN de doble cadena (*i.e.*, dsRNA) es un potente inductor de respuestas antivirales en muchos organismos, incluido el camarón (Robalino *et al.*, 2004, 2005; Tirasophon *et al.*, 2005; Westenberg *et al.*, 2005), a través de la activación de mecanismos de silenciamiento genético como ARNi (Hammond *et al.*, 2001; McManus & Sharp, 2002). Este es un mecanismo conservado evolutivamente, y muchas células animales lo utilizan con diferentes propósitos. El ARNi es un proceso natural por el cual ARN de doble cadena es catalizado por enzimas específicas para convertirlo en ARN de cadena simple de 20-25 nt (ssRNA, siglas en inglés) que dirigen el silenciamiento de genes homólogos (Hammond *et al.*, 2001; McManus & Sharp 2002). El ARNi se ha utilizado para inhibir específicamente la

expresión de genes y la replicación de virus infecciosos (Randall *et al.*, 2003).

El camarón no posee un sistema inmunológico basado en memoria (*e.g.*, anticuerpos), sino un sistema inmune innato que puede mediar defensas de corto plazo ante infecciones bacterianas o virales (Berger 2000; van de Braak *et al.*, 1996). Los mecanismos de defensa innata incluyen el sistema profenoloxidasa (ProPO) y la expresión de péptidos antimicrobianos (Destoumieux *et al.*, 1997; Söderhäll *et al.*, 1994).

El presente trabajo tiene como objetivo principal identificar genes involucrados en la respuesta antiviral del camarón *L. vannamei*. Se evaluarán 54 genes considerados candidatos en base a estudios previos de la respuesta antiviral en *L. vannamei* (Robalino *et al.*, 2007; Robalino *et al.*, 2006). Estos genes fueron seleccionados en base a tres criterios: 1) su expresión aumenta en respuesta a una inyección de dsRNA, 2) su expresión aumenta en respuesta a infección con WSSV, ó 3) su importancia para el sistema inmune del camarón ha sido determinada en estudios previos. Cada uno de los 54 genes candidatos cumple con al menos uno de estos 3 requisitos. Se considera de interés a aquellos genes cuya expresión aumenta en respuesta a dsRNA, porque ha sido establecido que la introducción de dsRNA (independiente de su secuencia) induce en el camarón *L. vannamei*

una respuesta protectora contra infecciones virales (Robalino et al., 2004; Tirasophon et al., 2005; Westenberg et al., 2005). Los mecanismos responsables de este fenómeno son desconocidos, pero parecen ser independientes del ARNi (Robalino et al, 2005).

La inyección de dsRNA en *L. vannamei* causa no sólo una respuesta antiviral inespecífica, sino también el silenciamiento de la expresión de genes cuya secuencia es homóloga al dsRNA inyectado (i.e., ARNi). Tomando en cuenta estos dos efectos, respuesta antiviral y ARNi, respectivamente, la hipótesis que se plantea es la siguiente:

Para genes importantes en la respuesta antiviral de *L. vannamei*, la inyección de un dsRNA homólogo a los genes candidatos resulta en una respuesta inmune deficiente en comparación con dsRNAs utilizados como controles en este estudio (i.e., homólogos a secuencias de genes de inmunoglobulinas de vertebrados). Dicha respuesta antiviral deficiente sería el resultado de la expresión reducida del gen considerado de defensa (mediante el mecanismo de ARNi), cuya actividad sería importante para el sistema inmune antiviral.

Además de la evaluación de estos genes in vivo (mediante desafíos virales), el análisis bioinformático de las secuencias de genes candidatos en *L. vannamei* (GenBank, NCBI) permitió predecir las proteínas putativamente codificadas de cada uno de los genes estudiados. La reconstrucción

bioinformática de los genes transcritos es necesaria, ya que la secuencia del genoma para *L. vannamei* no está disponible.

En su conjunto, el estudio planteado sirvió para definir genes de importancia para la respuesta antiviral del camarón, así como generar información sobre las posibles funciones o actividades asociadas con estos genes.

CAPITULO 1

1. ANTECEDENTES

La industria camaronera representa el 95% de actividad acuícola en el Ecuador (UN-FAO). Este sector sufrió estragos a finales de los años 90, debido a la presencia de una nueva enfermedad viral, causada por el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV, siglas en inglés).

El WSSV es un patógeno virulento, con amplio espectro de hospederos dentro del subfilum Crustacea (Flegel *et al.*, 1997; Lightner & Redman 1998b). En Ecuador, en sólo seis meses desde su primera aparición, el

WSSV estuvo asociado con pérdidas de hasta 63000 toneladas de camarón cultivado, con un valor de 280 millones de dólares Americanos (Alday de Graindorge & Griffith 2000).

Las estadísticas de la Cámara Nacional de Acuicultura (CNA) confirman el impacto del WSSV en la industria camaronera Ecuatoriana (Figura 1). Las exportaciones de camarón disminuyeron drásticamente de 94 millones de TM en 1999 a 37 millones de TM en el 2000, manteniéndose en niveles relativamente bajos en el 2001. A partir del 2002 el sector camaronero ha visto una recuperación gradual de los niveles de producción, habiéndose alcanzado en la actualidad 133 millones de TM aproximadamente, niveles comparables a lo observado previo a la aparición de WSSV.

El severo impacto de WSSV y otras enfermedades virales en la industria camaronera impone la necesidad de desarrollar mejores estrategias sanitarias y de control. Entre los avances que serán necesarios en este campo se encuentra una mejor comprensión de los mecanismos antivirales del camarón. Esto permitirá en el futuro implementar medidas de manejo y programas de mejoramiento genético que contribuyan a disminuir el impacto negativo de los virus en esta industria.

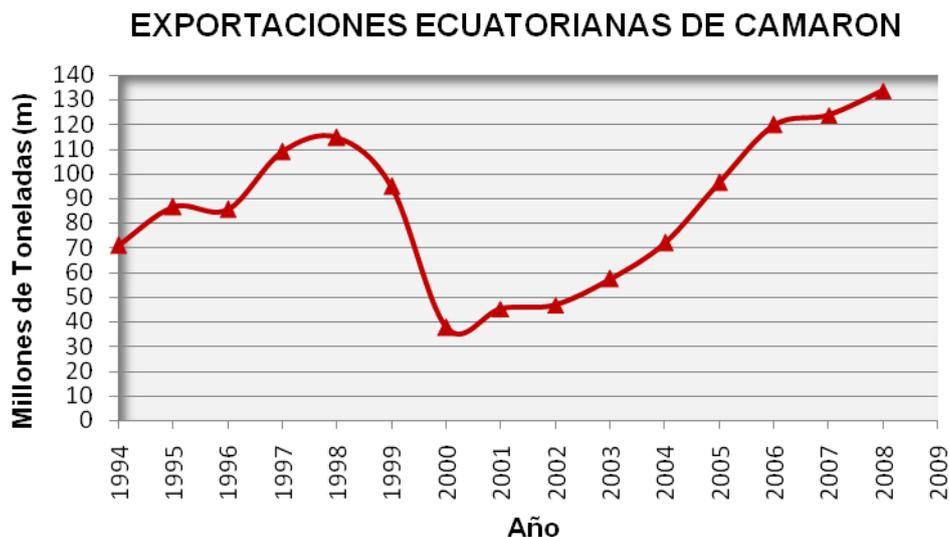


Figura 1. En La curva se observa una recuperación anual de exportaciones de camarón desde el año de 2002. Fuente: Datos tomados del CNA (Camara Nacional de Acuicultura).

1.1 White Spot Syndrome Virus (WSSV)

1.1.1. Descripción de la enfermedad.

La enfermedad de la mancha blanca (WSD) es causada por el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) que afecta a la producción de crustáceos en diferentes partes del mundo (Bonnichon *et al.*, 2006).

El WSSV tiene un amplio rango de huéspedes y afecta múltiples tejidos (Chang *et al.*, 1996; Hossain *et al.*, 2001). Tejidos de origen ectodermal y mesodermal son infectados por el virus incluyendo el epitelio cuticular, tejido conectivo de algunos órganos, tejido nervioso, músculos, órganos linfoides y tejido hematopoyético. También causa daño en el tejido del estómago,

branquias, glándula antenal, corazón y ojos: durante estadios tardíos de la infección, estos órganos son destruidos y algunas células son lisadas (Chang *et al.*, 1996)

Mortalidades de hasta el 100% son frecuentemente observadas en poblaciones de cultivo infectadas con WSSV. Normalmente las fases de engorde son las más afectadas, con poco impacto del virus durante los estadios larvarios. Aparte de estrategias de exclusión del patógeno, a través de protocolos de monitoreo y bioseguridad, la única medida eficaz de control es el cultivo a temperaturas no permisivas para el virus (>31 °C). Por razones que a la fecha no han sido clarificadas, en animales infectados con WSSV a temperaturas mayores a 31 °C hay poca replicación viral y el desarrollo de la enfermedad se ve interrumpido (Vidal *et al.*, 2001; Granja *et al.*, 2003).

1.1.2. Biología Molecular del Virus

El virus de la mancha blanca tiene un genoma de ADN circular de doble cadena de gran tamaño, y una envoltura lipídica exterior a la nucleocápside (Vlak *et al.*, 2006). Se ha determinado la secuencia completa del genoma en tres aislados diferentes, provenientes de China, Tailandia y Taiwan (Chen *et al.*, 2002b, Van Hulten *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001). El potencial codificante en el genoma de WSSV, considerando ambas cadenas del genoma es de

entre 531 y 684 marcos abiertos de lectura (ORFs, siglas en inglés). Entre ellos, 180 a 184 ORFs codifican para polipéptidos putativos de entre 51 y 6077 amino ácidos (aa) (Van Hulten *et al.*, 2001, Yang *et al.*, 2001).

El virus de la Mancha Blanca presenta genes que codifican proteínas estructurales y proteínas no estructurales. Los genes estructurales codifican las proteínas que forman parte de la envoltura y la capsida, mientras que los genes no estructurales codifican las proteínas y enzimas que intervienen en el metabolismo de los nucleótidos y la replicación del virus. Las proteínas estructurales son probablemente importantes en la adhesión celular, en la transducción de señales y en la evasión de las defensas antivirales del hospedero (Li *et al.*, 2007). Estas proteínas son importantes porque son las primeras moléculas que interactúan con las células del huésped (Tsai *et al.*, 2006). Las diferentes proteínas estructurales se distinguen por su masa molecular en kilo Daltones, así se pueden identificar las proteínas virales VP19, VP28, VP15, VP24 y VP26.

Entre las pocas proteínas no estructurales de WSSV cuya función es conocida, o predecible en base a su secuencia, están las subunidades grandes y pequeñas de la ribonucleótido reductasa (Tsai *et al.*, 2000a, Van Hulten *et al.*, 2000b), dos proteínas kinasas (Van Hulten & Vlak 2001, Yang *et al.*, 2001), el polipéptido quimérico timidina kinasa-timidilato monofosfato

kinasa (Tsai *et al.*, 2000b) y una polimerasa de ADN (Chen *et al.*, 2002). De hecho, la función de la gran mayoría de proteínas codificadas en el genoma de WSSV es desconocida. En base a la ausencia de virus filogenéticamente relacionados a WSSV, se ha designado una nueva familia, Nimaviridae, género Whispovirus, de la cual el WSSV es el miembro fundador (Van Hulten & Vlak 2001, Yang *et al.*, 2001).

El o los receptor(es) necesarios en la superficie de la célula huésped para iniciar una infección con WSSV no han sido determinados. En base a la capacidad de WSSV para infectar una gran variedad de tejidos de distinto origen, y de utilizar como huésped a una amplia gama de crustáceos, se presume que los receptores son proteínas conservadas y de amplia distribución en crustáceos. Un grupo de proteínas candidatas incluye las integrinas, que son moléculas que frecuentemente sirven como receptores de los virus envueltos (Li *et al.*, 2007).

En el genoma del WSSV al menos seis proteínas estructurales presentan motivos RGD (arginina, glicina, ácido aspártico); (Huang *et al.*, 2002b, Yang *et al.*, 2001). Una en particular, VP187, tiene la capacidad de interactuar con la integrina beta de camarón, y dicha interacción parece ser importante para el proceso infeccioso (Li *et al.*, 2007).

1.1.3. Epidemiología del Virus

1.1.3.1 Especies afectadas.

WSSV tiene un amplio rango de huéspedes que incluye más de 40 especies de cangrejos, copépodos y otros artrópodos (Cai *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998). El virus infecta naturalmente a todos los camarones peneidos cultivados (Wongteerasupaya *et al.*, 1995; Lo *et al.*, 1996; Flegel, 1997; Lightner *et al.*, 1997; Nunan *et al.*, 1998; Sahul Hameed *et al.*, 1998).

La presencia de WSSV ha sido reportada en camarones carideos (*Exopalaemon orientalis*, *Macrobrachium rosenbergii*, *M. idella* y *M. lamerrae*) (Chang *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998; Sahul Hameed *et al.*, 2000), crayfish (*Cambarus clarki* y *Pacifastacus leniusculus*); (Huang *et al.*, 2001; Jiravanichpaisal *et al.*, 2001), cangrejos salvajes (*Calappa lophos*, *Portunus sanguinolentus*, *Portunus pelagicus*, *Caribdis sp.*, *Helice tridens* y *Silla serrata*); (Chang *et al.*, 1998, Kanchanaphum *et al.*, 1998 Chen *et al.*, 2000; Corbel *et al.*, 2001), langostas salvajes (*Scyllarus arctus* y *Panulirus sp.*; Chang *et al.*, 1998), y copépodos planctónicos, así como en pupas de insectos *Ephydridae* (Wang *et al.*, 1998). Infecciones experimentales han sido demostradas en cangrejos de agua dulce (*Paratelphusa hydrodomous* y *Paratelphusa pulvinata*), y *Artemia sp.* (Sahul Hameed *et al.*, 2001,2002), y en varias especies de peneidos (Hossain *et al.*, 2001; Lo. *et al.*, 1996b.).

1.1.3.2 Transmisión.

El virus de WSSV se transmite principalmente de manera horizontal. La transmisión horizontal ocurre por vía oral cuando existe depredación, cohabitación o inclusión en la dieta de hospederos infectados (Soto & Lotz, 2001) y por la presencia de partículas virales en el agua, a través de las branquias o de otras superficies del cuerpo (Wu *et al.*, 2001). La transmisión vertical vía oocitos no ha sido confirmada, sin embargo partículas virales han sido detectadas en los oocitos (Lo *et al.*, 1997). Por otro lado, es muy probable que las partículas virales liberadas a partir del tejido ovárico después del desove puedan infectar estadios larvales tempranos (Alday de Graindorge & Flegel, 1999).

1.1.3.3 Fuentes del Virus.

Los parámetros epidemiológicos que determinan la propagación del virus en poblaciones de cultivo, a partir de unos pocos camarones infectados, aún no han sido descritos en detalle. Se piensa que la cohabitación de los camarones sanos con los infectados, vía canibalismo o por medio de heces puede provocar rápidamente la enfermedad generalizada en un plazo de 36 a 48 horas (Lo, *et al.*, 1996b). El agua de transporte infectada, suministro

rutinario de agua de recambio, redes y otros implementos de cultivo; son otras fuentes de infección posibles (Sitio Web: www.oie.int).

En los Estados Unidos se reportó un brote infeccioso de WSSV en una camaronera, debido a la proximidad de una planta procesadora de camarón, la cual procesaba grandes cantidades de camarón proveniente de zonas afectadas por WSSV en Asia (Tapay *et al.*, 1996). Este ejemplo de contaminación indirecta, a través de material importado, ilustra la importancia de un control epidemiológico integral para el mejor manejo de enfermedades en la acuicultura del camarón.

1.1.3.4 Distribución Geográfica

El Virus del Síndrome de la Mancha Blanca ha sido reportado en prácticamente todas las regiones del mundo donde se cultiva camarón. Después de su aparición en 1992-1993, en el noroeste de Asia, este virus se dispersó rápidamente a través de la mayoría de las regiones cultivadoras de camarón en Asia e Indo Pacífico (Lightner, 1996), y eventualmente en las Américas.

En noviembre de 1995, ocurrió el primer caso confirmado de WSSV en el hemisferio occidental. En este caso, se trataba de camarones cultivados (*P. setiferus*) en una granja del sur del estado de Texas (Tapay *et al.*, 1996). Más adelante, a finales del año 1999, ocurrió el primer caso confirmado de WSSV

en América Central. Hoy en día, la enfermedad se ha dispersado a México, Nicaragua, Honduras, Costa Rica, Panamá, Ecuador, Perú, Colombia y Brasil.

Venezuela se mantiene libre de WSSV debido a la pronta y efectiva respuesta de cerrar la frontera en 1999 a todas las importaciones de crustáceos (Briggs *et al.*, 2005). Los Estados Unidos también lograron erradicar WSSV de su industria de cultivo de camarón en 1997, a través de la implementación de medidas de Bioseguridad, que incluyó el uso de reproductores libres de patógenos (Lightner, 2002).

1.2 ARN de doble cadena (dsRNA) y respuestas antivirales independientes de ARN de interferencia (ARNi).

1.2.1 Respuestas antivirales innatas inducidas por dsRNA en Vertebrados

En células normales la formación y acumulación de ARN de doble cadena (*i.e.*, dsRNA) se mantiene bajo estricto control molecular (*e.g.* precursores de micro ARNs que regulan expresión genética a través de ARN de interferencia), a diferencia de células infectadas con virus, en las cuales moléculas de dsRNA se generan como resultado de la replicación viral y de

la expresión de genes virales (Jacobs & Langland 1996; Kumar *et al.*, 1998; Weber *et al.*, 2006).

Los mecanismos inmunes innatos parecen haber evolucionado la capacidad de reconocer dsRNA como un indicador molecular de infecciones virales, independiente de su secuencia genética. Esto presume que los mecanismos innatos de defensa antiviral se pueden activar contra una amplia gama de posibles patógenos virales (Lee *et al.*, 1994; Bagasra *et al.*, 2004).

El sistema inmune innato detecta componentes virales o microbianos a través de receptores denominados “receptores para el reconocimiento de patrones” (PRRs, siglas en inglés), que reconocen a los patrones moleculares asociados a agentes patógenos (PAMPs, siglas en inglés), tales como ADN genómico, ARN de cadena simple, ARN de cadena doble, ARN con terminales 5'-trifosfato y proteínas virales (Janeway 1989; Akira *et al.*, 2006; Petrilli *et al.*, 2007).

Al menos tres PRRs son importantes para la detección de dsRNA de origen viral: Receptor similar a Toll 3 (TLR3, siglas en inglés), Gen inducible por ácido retinoico-I (RIG-I, siglas en inglés), y Gen asociado a la diferenciación de melanoma 5 (MDA5, siglas en inglés). Estos receptores tienen afinidad por dsRNA con características estructurales diversas (Akira & Takeuchi 2006;

Kawai & Akira 2007), y su ausencia *in vivo* está asociada con una mayor susceptibilidad a infecciones virales (Kato *et al.*, 2006 & 2008; Koyama *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2006; Samanta *et al.*, 2006 & 2008). Su importancia para el sistema inmune antiviral radica en que, subsecuente al reconocimiento del dsRNA viral, estimulan la producción de interferones (IFNs, siglas en inglés). IFNs son citoquinas con funciones diversas, entre ellas la estimulación de un estado antiviral a través de mecanismos que incluyen la inhibición de síntesis de proteínas y la producción de moléculas antivirales (Madigan *et al.*, 2000; Levy & Garcia Sastre, 2001).

1.2.2 Respuestas antivirales inducidas por dsRNA en Invertebrados.

Investigaciones realizadas en *L. vannamei* mostraron que el dsRNA induce una respuesta protectora contra infecciones virales (Robalino *et al.*, 2004; Tirasophon *et al.*, 2005; Westenberg *et al.*, 2005). El camarón al ser previamente tratado con dsRNA, mostró una mayor resistencia a la infección por dos virus, WSSV y el Virus del Síndrome de Taura. La inducción de este estado antiviral era independiente de la secuencia del dsRNA usado (Robalino *et al.*, 2005). Esto sugiere que el sistema inmune en invertebrados, al igual que el de los vertebrados, puede reconocer un dsRNA como un PAMP asociado a un virus, resultando en la activación de una respuesta innata antiviral.

Otros estudios realizados en insectos confirman que dsRNAs en invertebrados inducen protección antiviral. La primera demostración de un gen inmune inducido por dsRNA en insectos se realizó en pupas de *Antheraea pernyi* (Lepidoptera: Saturniidae), cuando se inyectaron dsRNAs de hemolin y GFP (Green fluorescent protein) en dosis de 2 ug. La inyección de cada uno de estos dsRNAs incrementó la expresión del gen Hemolin (Hirai *et al.*, 2004). El hemolin es una de las proteínas de la hemolinfa que es fuertemente inducida en una infección bacteriana en *Hyalophora cecropia* (Faye *et al.*, 1975; Rasmuson & Boman, 1979), y funciona como una opsonina involucrada en la regulación de la respuesta celular inmune (Lanz-Mendoza *et al.*, 1996). En células de la mosca *Lutzomyia longipalpis* la introducción de dsRNA de aparentemente cualquier secuencia es también capaz de inducir protección antiviral (Pitaluga *et al.*, 2008).

Estos estudios demuestran que en varias especies de invertebrados dsRNAs pueden inducir respuestas antivirales independientemente de su secuencia. Los mecanismos responsables del estado antiviral inducido por dsRNAs en estos casos son desconocidos.

1.3 ARN de interferencia (ARNi)

El ARNi es un proceso natural conservado evolutivamente, utilizado para el silenciamiento de genes en animales y plantas (Fire *et al.*, 1998; Covey *et al.*,

1997; Ratcliff *et al.*, 1997). En la actualidad es usado a nivel experimental para regular específicamente la expresión de genes e inhibir la replicación de virus infecciosos (Randall *et al.*, 2003).

El ARNi está relacionado con varios procesos celulares por los cuales moléculas de dsRNA dirigen la supresión o disminución de la expresión de un gen (Hammond *et al.*, 2001; McManus & Sharp, 2002). Los mecanismos de silenciamiento tipo ARNi dependen de la acción de un complejo proteico en asociación con una cadena corta de ARN, para suprimir la expresión de genes cuya secuencia presenta suficiente identidad con la secuencia de dicho ARN. La inhibición de la expresión genética puede darse a través de mecanismos diversos, ya sea induciendo la degradación de una secuencia específica de ARN mensajero (ARNm), inhibiendo su traducción, o modificando la cromatina (Carrington *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004; Grishok *et al.*, 2001).

El proceso de ARNi inicia con el procesamiento de dsRNAs largos dentro de la célula por la enzima Dicer, una ribonucleasa tipo III, que genera pequeños ARNs de 21 – 23 nucleótidos con extremos 5' fosfato y 3' dinucleotidos (2-3 nt) denominados siRNA por sus siglas en inglés (Bernstein *et al.*, 2001). Estos dsRNAs cortos (*i.e.*, siRNA) se asocian a un complejo de proteínas llamado RISC (RNA-induced silencing complex, en inglés) que actúa como

helicasa para separar las cadenas, dejando sólo la cadena antisentido asociada al complejo. La cadena antisentido dirige al RISC hacia el ARNm blanco utilizando su complementariedad de bases (Hutvagner & Simard 2008; Meister *et al.*, 2004) y consecuentemente el ARNm es degradado (Geley *et al.*, 2004) (Figura 2).

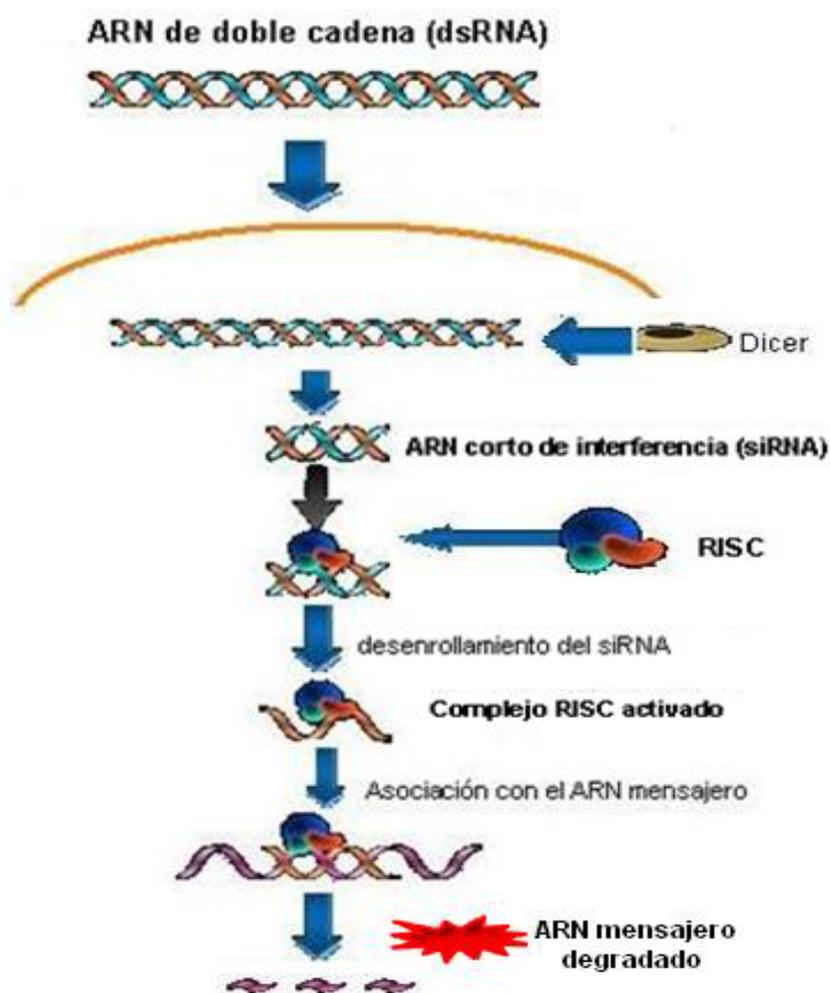


Figura 2. Esquema General del Silenciamiento por medio de ARN de interferencia. El dsRNA dentro del citoplasma es procesado por la enzima Dicer que lo corta en fragmentos cortos (21 nt). Este fragmento corto forma un complejo con el RISC el cual contiene la enzima Argonata II que dirige la degradación del ARN mensajero y/o la inhibición de la traducción.

1.4 ARN de interferencia en Crustáceos

La presencia del fenómeno de ARNi en crustáceos fue reportado por primera vez en estudios realizados en *L. vannamei* (Robalino *et al.*, 2005). Para probar la existencia de ARNi en *L. vannamei*, dsRNA específicos para dos genes endógenos fueron inyectados intramuscularmente en el abdomen del camarón. La reducción en la expresión de los ARNms de estos genes, después de 48 horas, confirmó que la administración de un dsRNA homólogo a un gen específico puede activar el mecanismo de ARNi y silenciar genes endógenos en el camarón.

En años recientes en el camarón *P. monodon* se ha identificado la secuencia completa de ADN complementario (cDNA, siglas en inglés) de dos componentes importantes de la maquinaria de ARNi, que ratifica la presencia de este mecanismo en camarones peneidos (Su *et al.*, 2008; Dechklar *et al.*, 2008). El primero corresponde al cDNA que codifica para la proteína Dicer-1 (*i.e.*, PmDcr1), que contiene los 7 dominios funcionales presentes en otros Dicers de vertebrados e invertebrados y que es similar en un 34.6 % al Dicer-1 del mosquito *Aedes aegypti* (Su *et al.*, 2008). El segundo es el cDNA que codifica para la proteína Argonauta (*i.e.*, Pem-Ago) que presenta homología al Argonauta 1 (dAgo1) de la *Drosophila melanogaster* (Dechklar *et al.*, 2008).

En otras especies se ha demostrado que ambos elementos son esenciales para que el silenciamiento genético se lleve a cabo (Bernstein *et al.*, 2001; Hammond *et al.*, 2001; Keene *et al.*, 2004; Dechklar *et al.*, 2008).

En el trabajo realizado por Dechklar y colaboradores también se estudió la función del Pem-Ago en el ARNi en *P. Monodon* (Dechklar *et al.*, 2008). Se reportó que la introducción de un dsRNA homólogo a la secuencia del gen Pem-Ago (dsRNA-PAZ) no sólo reduce la expresión del ARNm del Pem-Ago sino que también reduce el efecto de silenciamiento de otro gen endógeno, después de haber sido administrado un dsRNA específico. Estos resultados corroboran que el Pem-Ago es esencial para la maquinaria de ARNi en camarones peneidos.

Estos trabajos demuestran que el mecanismo de ARNi existe en crustáceos y que al parecer es muy similar al de otros invertebrados como *C. elegans* (Fire *et al.*, 1998), *Drosophila melanogaster* (Goto *et al.*, 2003) y mosquito *Anopheles gambiae* (Keene *et al.*, 2004).

CAPITULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Preparación de Sustratos para la Síntesis de dsRNA

Los sustratos (fragmentos de ácidos nucleicos) para la síntesis de dsRNA se obtuvieron de la amplificación de insertos de ADN provenientes de librerías de ADN complementarios (cDNA, en inglés) de *L. vannamei* (Gross *et al.*, 2001; Robalino *et al.*, 2007), mediante PCR simple. Todos los cDNAs o fragmentos de cDNAs de *L. vannamei* fueron gentilmente donados por el Marine Genomics Group de la Medical University of South Carolina (Charleston, SC, EUA).

Para cada sustrato (*i.e.*, fragmento de cDNA representando un gen candidato) se realizaron 4 reacciones de PCR de 100 μ l cada una. Cada reacción contenía Buffer 1x Green GoTaq® Flexi marca Promega (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 1.5mM de $MgCl_2$ (Promega), 0.2 mM de dNTPs (Invitrogen), 0.5 μ M de cada iniciador (se usó iniciadores universales diseñados a partir de secuencias universales de los promotores T3 y T7 que se encuentran flaqueando los insertos en el vector de transporte), 1U/20 μ l GoTaq®polimerasa (Promega), 69 μ l de agua ultra pura y 2 μ l de ADN molde (Anexo A).

La reacción fue llevada a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ. Research) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, seguido por 37 ciclos de 20 s a 95°C, 20 s a 60°C, 1 min a 72°C, seguido por una extensión final de 72°C por 3 min.

Posteriormente se purificaron los productos de amplificación con el kit QIAquick (QIAGEN), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. La presencia del producto de amplificación esperado fue confirmada por electroforesis en gel de 0.8% de agarosa.

2.2. Preparación de ARN de doble cadena (dsRNA)

Posteriormente para formar el dsRNA, se realizó la transcripción *in vitro* produciendo fragmentos de ARN de simple cadena utilizando T3 RNA polimerasa para producir una cadena en sentido 5'-3' y T7 RNA polimerasa para una cadena en sentido 3'-5'. La reacción de transcripción contenía Buffer 1X (200mM Tris-HCl pH 7.9, 50mM NaCl, 30mM MgCl₂, 10mM spermidine), NTPs 0.5 mM marca Promega (2.5mM rATP, 2.5mM rGTP, 2.5mM rUTP, 2.5mM rCTP), DTT 10 mM, ARN polimerasa T3 o T7 (Promega) 400 Unidades, 50 µl de ADN amplificado y purificado (aproximadamente 10 ug), RNAsin 200 Unidades y 342 µl de agua ultra pura para obtener un volumen final de 800 µl.

Esta reacción se incubó a 37° C por 2 horas, luego se centrifugó a la máxima velocidad (14000 RPM) por 20 segundos, después se agregó 4 µl de ARN polimerasa (80U/µl) y se incubó a 37° C por 2 horas más. Para degradar el ADN presente se adicionó 5 µl de DNasa I (1U/µl) y se incubó a 37° C por 10 minutos.

Los transcritos obtenidos fueron purificados con extracción utilizando solventes orgánicos (fenol y cloroformo) y precipitados con etanol por métodos tradicionales.

Finalmente se mezclaron en un solo tubo de 1.7 ml, las cadenas sentido y anti sentidos de los fragmentos de ARN producidos por transcripción para generar la hibridación en solución salina (*i.e.*, 10mM Tris-Cl pH 7.5, 0.4M NaCl). Para realizar este procedimiento se incubó a 75°C por 15 minutos, a 65°C por 15 minutos más y finalmente a temperatura ambiente por 15 minutos. Se realizó la síntesis de ambas cadenas de ARN en reacciones independientes con el fin de asegurar la presencia de ambas cadenas al momento de ensamblar las moléculas de ARN bicatenario.

Los productos obtenidos se almacenaron en el congelador, la concentración de dsRNA se midió por espectrofotometría. La formación de dsRNA y la visualización de los productos de PCR fue monitoreada en geles de 1.2% de agarosa ultra pura (Invitrogen) teñida con bromuro de etidio como se muestra en la Figura 3.

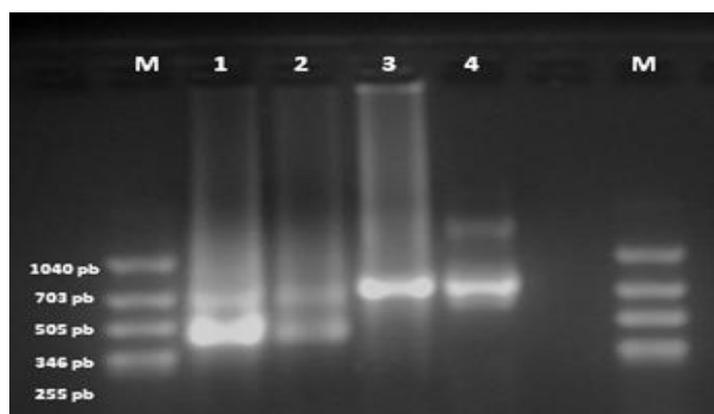


Figura 3: Gel de Agarosa con productos obtenidos de transcripción, hibridación y amplificación para obtención de sustrato. M=marcador de peso molecular; 1=ARN simple cadena sintetizado con ARN polimerasa T7; 2= ARN simple cadena sintetizado con ARN polimerasa T3 a partir del mismo fragmento de ADN utilizado para generar (1); 3= ARN doble cadena formado luego de hibridar los ARNs mostrados en (1) y (2); 4=fragmento de ADN usado para sintetizar los ARNs en (1) y (2).

2.3. Levantamiento de animales experimentales a partir de larvas

Previo a las pruebas de desafío los animales (*L. vannamei*) permanecieron en un área de cuarentena y levantamiento, apartada del área de infecciones experimentales. Antes de introducir animales en esta área de levantamiento se limpió el reservorio y los tanques, luego se desinfecto el agua del reservorio con cloro a 100 ppm y se neutralizo con tiosulfato de sodio.

Una vez listo el reservorio y los tanques, se receptaban aproximadamente 20000 animales provenientes del laboratorio de larvas BIOGEMAR S.A., San Pablo, para ser sembrados en los tanques con sistema de aireación de piedras difusoras y lámparas infrarrojas para las noches frías de verano, manteniendo una temperatura del agua de 30°C aproximadamente, y provistas de tapas plásticas para evitar contaminación procedente del medio.

Estos tanques tenían recambios de agua del 70%, a su vez los animales eran alimentados 3 veces al día. En cada tanque se hizo muestreo semanal para determinar el peso promedio con la finalidad de obtener animales de 1 gramo en promedio.

2.4. Infecciones Experimentales

Inoculo Viral

El material infeccioso original (*i.e.*, papilla de camarones infectados) fue gentilmente donado por el Dr. José Melena, CENAIM-ESPOL. Camarones de aproximadamente 1 g fueron inyectados con 20 μ l de este material, y colectados durante varios días a medida que presentaban signos obvios de enfermedad (letargia, inadecuado consumo de alimento).

El hepatopáncreas, globos oculares y músculo abdominal fueron excluidos de las carcasas colectadas, y el material resultante fue homogenizado en 10 volúmenes de tampón TN (400 mM NaCl, 25 mM Tris-Cl, pH 7.5) en frío. El homogenizado resultante fue filtrado con gaza, centrifugado a baja velocidad para eliminar partículas, centrifugado luego a 10000 x g por 10 min, y finalmente el sobrenadante fue recuperado y filtrado por 0.2 μ m para eliminar posibles bacterias. El inoculo viral resultante fue preservado en nitrógeno líquido en alícuotas de uso único. La presencia de WSSV en el inoculo fue confirmada mediante PCR.

La dosis adecuada de inoculo viral a ser utilizada en desafíos fue determinada empíricamente mediante pruebas preliminares de titulación. Se

inyectaron grupos de animales con diluciones seriales del inóculo (20 µl por animal) y se monitoreó la mortalidad resultante durante 7 días.

Sala de Experimentación

Se establecieron medidas de bioseguridad para minimizar la posible liberación de material infeccioso, y para impedir la introducción de otros patógenos que puedan afectar el resultado de los bioensayos. La sala experimental disponía de un tanque reservorio donde se trataba el agua de mar (100 ppm de hipoclorito de sodio y 15 ppm de tiosulfato de sodio) que sería usada en el bioensayo, un tanque de oxígeno para airear el agua del reservorio, un calefón para mantener la temperatura 28°C– 30°C en la época fría de verano y un aire acondicionado para la época de invierno. El espacio físico se dividió en dos áreas por una pared de plástico, en una área se colocaban los tratamientos del bioensayo y la otra era específicamente para la limpieza de los sistemas de desafíos individuales.

Diseño experimental

Para cada tratamiento se utilizaron 40 individuos (*i.e.*, camarones *L. vannamei* con un peso promedio entre 0.8 a 1g) colocados en sistemas de desafíos individuales (recipientes de plástico) con aproximadamente 150 ml de agua de mar (34 ppt) previamente tratada (100 ppm de hipoclorito de sodio y 15 ppm de tiosulfato de sodio) (Figura 4).

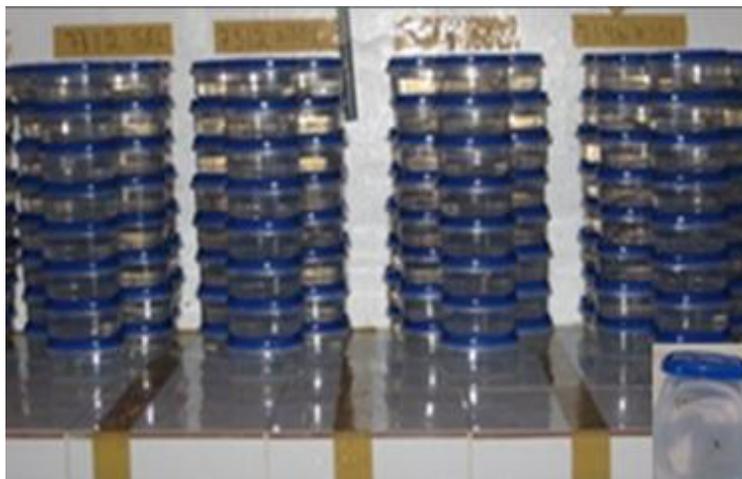


Figura 4. Sistemas de desafíos individuales. Los recipientes contenían 1 camarón de peso aproximado de 1 gr. Se agruparon 40 individuos por tratamiento, formado en dos grupos: el primero dsRNA-Solución salina y el segundo dsRNA-WSSV.

Los animales eran aclimatados por un período de 2 a 3 días, con un recambio diario del 100 % y alimentados diariamente con alimento comercial para camarones. Después de la aclimatación, fueron tratados con una inyección intramuscular de dsRNA (4 μg /individuo.) en el cuarto segmento abdominal y 72 horas más tarde fueron desafiados con inóculo de WSSV. En los tratamientos que no fueron desafiados con WSSV se les suministró inyección con solución salina para causar el mismo estrés en todos los tratamientos. La mortalidad fue registrada diariamente durante los 18 días que duró el experimento.

En cada bioensayo se llevaron 3 controles: animales inyectados con solución salina estéril 10mM Tris-Cl pH 7.5, 0.4M NaCl (control negativo sin WSSV), animales inyectados sólo con WSSV (control positivo), y animales inyectados

con dsRNAs de secuencias no relacionadas a genes de camarón (control de dsRNA inespecífico¹). Aparte de estos controles generales, para cada gen se llevó un control adicional que constó de animales inyectados con el dsRNA homólogo al gen de estudio, pero sin infección con WSSV.

2.5. Bioinformática

La secuencia del genoma para *L. vannamei* aún no está disponible, pero el análisis bioinformático de ESTs² (Expressed Sequence Tags, en inglés) permitió predecir las proteínas putativamente codificadas, reconstruir las posibles regiones codificantes de los 54 genes candidatos (GenBank, National Center for Biotechnology Information, NCBI) y generar información sobre las funciones o actividades asociadas con estos genes. Los 54 genes evaluados en este estudio fueron seleccionados porque en base a estudios de expresión utilizando chips de ADN (microarrays en inglés) mostraron ser inducidos en animales inyectados con dsRNA o infectados con WSSV (Robalino *et al.*, 2006).

¹ En este estudio se utilizaron secuencias derivadas de dos genes de inmunoglobulinas de vertebrados como control inespecífico a la respuesta antiviral: 95114A, que representa una porción de 309 pb de ADN genómico de *Anas platyrhynchos* con # GenBankAJ312200 o S114, que representa un fragmento de 1316 pb de ADN genómico de *Ictalurus punctatus* con # GenBank CC936713.

² Un EST es una sub-secuencia corta de una secuencia de cDNA transcrito (The NCBI Handbook, Part 3, Chapter 21), usados en el descubrimiento de genes y determinación de su secuencia (Adams *et al.*, 1991).

La reconstrucción de los genes putativos fue realizada con la ayuda de varios software de acceso público. El primer paso fue la reconstrucción de la secuencia de cDNA más larga posible para cada gen. Para esto se recopilaron de GenBank todos los ESTs de *L. vannamei* con identidad significativa a un EST inicial y se ensamblaron en una secuencia contigua (contig) utilizando el software CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>). A partir del contig generado con CAP3 se establecieron las posibles regiones codificantes, estableciendo el codón de iniciación y marco de lectura más probables.

Para la traducción de las secuencias se usó software EXPASY Proteomics Server (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>) y para la determinación de las proteínas e identificación de los dominios funcionales se utilizó el software BLAST (Basic Local Alignment tools, en inglés) de NCBI (*i.e.*, blastx, blastp).

2.6. Análisis Estadístico

Para interpretar los resultados de la parte experimental se realizaron dos tipos de análisis:

1. Tablas de contingencia, para analizar si existe relación de dependencia o independencia entre las variables cualitativas de este

estudio. Las variables estudiadas fueron: supervivencia y tratamiento con dsRNA. Se analizaron tablas de tamaño 2x2, diseñadas para comparar la supervivencia (al final del periodo de desafío) en el grupo de animales inyectados con cada dsRNA específico versus la supervivencia en el grupo control correspondiente. Es decir, la prueba evaluó la posible asociación entre la inyección de un dsRNA específico (silenciamiento del gen correspondiente) y el nivel de supervivencia observado.

La prueba hace uso del estadístico χ^2 (*Chi-cuadrado*) para estimar un valor de p (con 1 grado de libertad) asociado con la hipótesis de que las variables analizadas son independientes. La figura 5 presenta un esquema de este análisis.

Mort.	dsRNA-sal	Neg	Total
m	n_{ij}	n_{ij}	$n_{i.}$
v	n_{ij}	n_{ij}	$n_{i.}$
Total	$n_{.j}$	$n_{.j}$	N

Mort.	dsRNA -WSSV	dsRNA Inespecífico-WSSV	Total
m	n_{ij}	n_{ij}	$n_{i.}$
v	n_{ij}	n_{ij}	$n_{i.}$
Total	$n_{.j}$	$n_{.j}$	N

N = tamaño de la muestra
 n_{ij} = número de observaciones
 $n_{i.}$ = números de individuos en filas
 $n_{.j}$ = número de individuos en columnas
m = muertos
v = vivos

Figura 5. Modelo aplicado para el análisis en tablas de contingencias.

2. El segundo parámetro calculado a partir de los datos de supervivencia es un índice de susceptibilidad, que permite clasificar los fenotipos observados, basado en el valor y signo del índice. La interpretación de este índice se describe en la sección de Resultados.

M.Ac = mortalidad acumulada

I.Sucp. = índice de susceptibilidad

CAPITULO 3

3. RESULTADOS

3.1 Resultados preliminares

3.1.1. Selección de 54 genes candidatos en base a estudios de expresión genética a gran escala

La inyección de dsRNA en camarones peneidos resulta en una mayor resistencia a infecciones virales, y se ha especulado que este fenómeno se debe a la inducción de genes antivirales (Robalino *et al.*, 2004). En base a esta premisa, se realizaron estudios previos a esta tesis en

donde se utilizaron chips de cDNA para identificar genes cuya expresión es más abundante en branquias de camarones inyectados con dsRNA, en comparación con animales inyectados con solución salina estéril (Robalino, 2006). La mayor parte de los genes estudiados en el presente trabajo (49 de 54) provienen de estos análisis. Adicionalmente, 5 genes fueron incluidos por corresponder a genes importantes o potencialmente importantes para el sistema inmunitario del camarón (tachylectina, factor anti-lipopolisacarido, PDGF, catepsina, y una proteína de función desconocida que incluye a un dominio tipo inmunoglobulina).

La Tabla i en la sección 3.2. enumera los clones de cDNA representantes de los 54 genes estudiados en el presente trabajo y describe un análisis bioinformático de dichos genes.

3.1.2 Implementación de un sistema de infección experimental individual.

Previo a los estudios de bloqueo genético de genes candidatos fue necesario establecer un sistema experimental adecuado para evaluar el efecto de bloquear genes específicos sobre la susceptibilidad a WSSV.

El parámetro que se midió en el transcurso de todos estos experimentos fue mortalidad post-infección. Se buscaron condiciones experimentales bajo las

cuales animales control (inyectados con un dsRNA inespecífico) mostraran mortalidades menores al 50% final, al ser infectados con WSSV. Este límite de 50% mortalidad cumulativa es arbitrario, pero adecuado para permitir la identificación de dsRNAs capaces de incrementar significativamente los niveles de mortalidad, por sobre el nivel basal (<50%) del tratamiento control.

Los parámetros que más influyen sobre los niveles de mortalidad observados en infecciones experimentales con WSSV (asumiendo condiciones abióticas normales) son: la dosis viral y la tasa de transmisión entre animales, especialmente vía canibalismo. Este segundo parámetro (*i.e.*, transmisión horizontal), a diferencia de la dosis viral, es difícil de controlar experimentalmente. Por lo tanto, se estableció un protocolo de infección en el cual cada animal fue físicamente aislado de todos los otros animales en el experimento. De esta forma se eliminó el factor de transmisión horizontal, permitiendo optimizar, como parámetro principal, la dosis viral a ser utilizada.

En las pruebas de optimización de dosis viral se buscó determinar la mayor dosis capaz de causar mortalidad menor al 50% en animales pre-inyectados con un dsRNA inespecífico. La inyección de un volumen fijo de inoculo viral diluido serialmente en grupos de animales individualizados permitió establecer un factor de dilución de 1:1 millón (10^{-6} vol: vol) como dosis óptima

(Figura 6). A esta dosis viral, animales control no estimulados (inyectados con solución salina) muestran mortalidades finales por sobre el 70%, mientras que animales pre-estimulados con dsRNA inespecífico muestran mortalidades de entre 30 y 40%. Bajo estas condiciones, la inyección de un dsRNA capaz de bloquear un gen antiviral debería resultar en mortalidades significativamente superiores al dsRNA inespecífico, y similares o superiores a los 70% observados en animales control no estimulados.

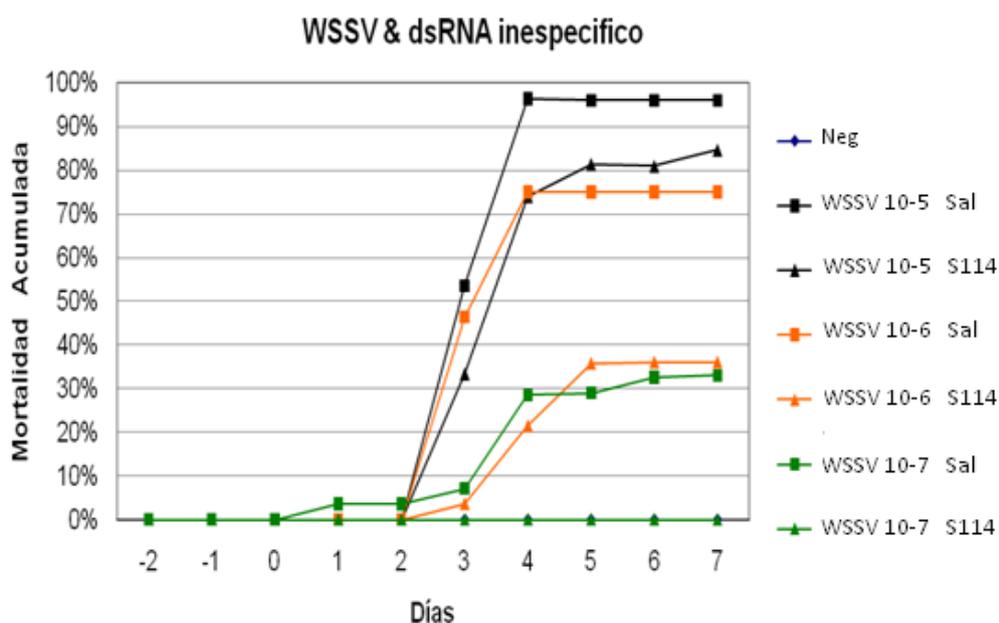


Figura 6: Determinación de dosis de WSSV óptimas para la evaluación del efecto de bloqueo genético sobre la susceptibilidad a WSSV. La dosis de 10^{-6} fue seleccionada para pruebas posteriores. Para cada dosis viral evaluada (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) se determinó la mortalidad en animales no estimulados, así como en animales inyectados con un dsRNA inespecífico (S114). La inyección de dsRNA fue aplicada 48 horas (día -2) previo a la infección con WSSV (día 0). La mortalidad en el control negativo sin virus (Neg) fue del 0%.

Otros parámetros de importancia en el sistema de infección experimental con animales individualizados incluyeron el uso de agua desinfectada y oxigenada, medidas de bioseguridad, y el uso de animales en un rango de peso entre 0.8 y 1 g. La temperatura del agua, que puede influir significativamente en la virulencia de WSSV, fue controlada regulando la temperatura ambiental, debido a los números muy altos de unidades experimentales (recipientes) y volúmenes pequeños de agua por unidad (100-200 ml) del sistema. Otros detalles técnicos son discutidos en la sección de Materiales y Métodos.

3.2 Análisis Bioinformático de Genes Candidatos

Como se describió en la sección 3.1.1, los genes evaluados en esta tesis fueron seleccionados a partir de clones utilizados como sondas en experimentos de expresión usando chips de cDNA. Sin embargo, la secuencia de dichos clones en su gran mayoría no representa la secuencia completa de la región codificante del gen de interés.

De hecho, en muchos casos, la identificación del gen de interés puede ser errónea en base a la secuencia de un clon único, por carecer de regiones críticas de la proteína codificada en el cDNA de interés. Es por esto que parte de esta investigación fue la reconstrucción, utilizando análisis de secuencias,

de la región codificante más probable para cada uno de los 54 genes estudiados.

El análisis Bioinformático desarrollado para tratar de reconstruir los genes de interés se detalla en el capítulo 2, sección 2.5. La figura 7 muestra un diagrama de flujo que resume el análisis Bioinformático realizado. Los resultados finales de dicho análisis se encuentran en la Tabla i.

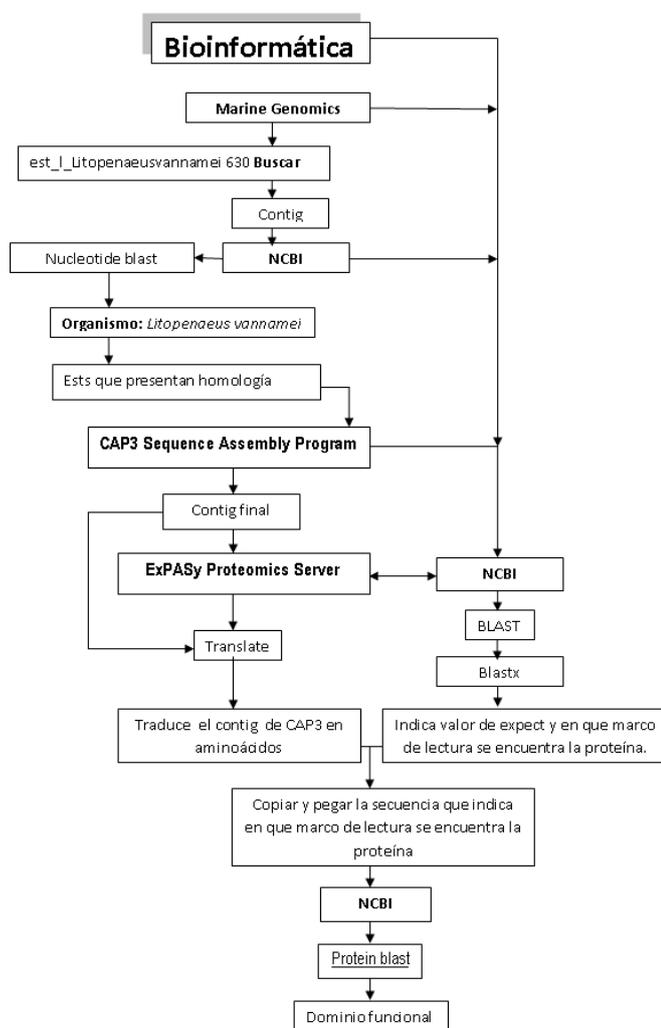


Figura7: Diagrama de Flujo del análisis Bioinformático realizado para cada uno de los genes evaluados.

Tabla i. Dominios funcionales de 54 genes evaluados.

¹ Acceso en NCBI correspondiente a la secuencia del clon inicial utilizado en las pruebas de expresión con chips de cDNA

² Dominios funcionales detectados utilizando BLASTp en el producto de traducción más probable codificado en el contig final ensamblado con CAP3

³ Probables funciones, definidas según las descripciones funcionales de cada dominio.

*Acceso en Marine Genomics correspondiente a la secuencia del clon inicial utilizado en pruebas de expresión con chip de cDNA.

Nº de Acceso del EST en NCBI ¹	Dominios funcionales ²	Probables funciones ³
CK725277	LDLa , CLECT lectina tipo C	Reconocimiento de proteínas glicosiladas y otros carbohidratos tanto endógenos como foráneos
CK570744	Granulinas	chemoquina en vertebrados
CK572129	Hsp70	Chaperona importante en la respuesta a diversas fuentes de estrés
CK571978	Chaperoninas	Complejo encargado del plegamiento de proteínas en la traducción
CK571943	Tiolasa	Enzima que actúa sobre los enlaces tiol (SH)
CK571718	Vigilin	Dominio ubicado en proteínas ribosomales, factores de transcripción y modificadores post-transcripcionales. Reconoce acidos nucleicos.
CK570770	DnaJ o J-. DnaJ/Hsp40	Dominio que media la interacción con Hsp 40 y estimula su actividad ATPasa.
CK591675	RRM	Es un dominio de unión al ARN implicada en la expresión genética y procesamiento de ARN
CK591701	Cofactor para el doblamiento de tubulina	Cofactor que actúa en el plegamiento de tubulinas formando una hélice beta
CK571271	Peroxidasas	Enzimas detoxificantes reductoras de peróxido de hidrogeno
CK572639	WD40	Actúa en la regulación de la transducción de señales, procesamiento del pre-ARN mensajero y ensamble del citoesqueleto.
CK572760	Catepsina D	Una proteasa importante en el catabolismo de las proteínas
CV133220	TB2/DP1 familia, HVA22	No descripción

CK591002	Acil-CoA -Crotonasas / enoil-coenzima A (CoA)	Coenzima encargada del metabolismo de los ácidos grasos
CK571807	PEPCK (fosfoenol piruvato carboxiquinasa)	Enzima importante en la gluconeogénesis
CK725515	Peptidasa C1A	Peptidasa que actúa sobre la cisteína cuya función es la degradación de proteínas en el lisosoma
CK743206	ATP-sintetasa C	Enzima encargada de la síntesis o hidrólisis del ATP
CK591327	Sin dominio funcional	No descripción
CK591655	sin dominio funcional	No descripción
CK571502	Familia Peptidasa M20/M25/M40	Enzimas encargadas de la digestión de proteínas
CK592593	Peroxirredoxina (PRX 1cys), Tiorredoxina, Reductasa hidroperóxido di alquilo AhpC	Peroxirredoninas son antioxidantes que regulan transducción de señales. Tiorredoxina importante en reacciones redox en proteínas. AhpC interviene en la reducción de hiperóxidos
*MGID515874	sin dominio funcional	No descripción
CK572962	Dominios relacionados con el fibrinógeno (Fred)	Dominio relacionado al fibrinógeno encargado del proceso de coagulación sanguínea
CK572496	Factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGF; Factor de crecimiento endotelial vascular VEGF	PDGF es la proteína que regula el crecimiento y la división celular. VEGF encargada de la formación de vasos sanguíneos
CK725284	sin dominio funcional	No descripción
CK572442	sin dominio funcional	No descripción
*MGID515663	sin dominio funcional	No descripción
CK572120	sin dominio funcional	No descripción
CK591121	sin dominio funcional	No descripción
CK591644	Factor anti-lipopolisacárido	Factor con funciones antimicrobianas
CK571145	sin dominio funcional	No descripción
CK572424	sin dominio funcional	No descripción
CK990141	sin dominio funcional	No descripción
CK572416	sin dominio funcional	No descripción
CK571262	sin dominio funcional	No descripción
CK571457	sin dominio funcional	No descripción
CK572105	sin dominio funcional	No descripción
CV468236	Sar1, Ras-like GTPasa.	Sar1 tiene actividad GTPasa que controla interacciones entre proteína y también entre lípidos

CV468320	Peptidasa subfamilia C1A	Peptidasa cisteína cuya función es la degradación de proteínas en el lisosoma
CK572708	V ATPasa I	Enzimas que liberan protones del ATP para acidificar compartimentos celulares
CK571517	Cadherinas	Una glicoproteína que regula la adhesión entre célula y célula
CK592250	Ribosomal L7Ae	involucrado en la traducción de ARNm a proteínas
CV468393	Mesd	Una proteína encarga de la transducción de señales celulares
CK572677	dominio SWIB MDM2	Se asocia con una proteína e inhibe un gen supresor tumoral
CK591233	dominio SWIB MDM2	Se asocia con una proteína e inhibe un gen supresor tumoral
*MGID514847	Histona de unión RBBP4 o subunidad C de complejos CAF1, WD40	CAF-1 es un complejo que dispone a las histonas para el ADN. WD40 es un complejo con varias funciones como procesamiento de pre-ARNm y ensamble del citoesqueleto
CK591012	Inositol polifosfato quinasa	Proteína de función vital en el sistema de transducción de señales
CV468041	Factor de iniciación eucariótico 1	Proteína encargada en la traducción de ARNm a proteínas
CK571791	Proteínas transportadoras	Proteínas transportadoras de energía en las mitocondrias
*MGID513560	Extremo C-terminal de la subunidad reguladora del Proteasoma	Subunidad del complejo proteico encargada de la degradación de proteínas
CK571864	sin dominio funcional	No descripción
CK591345	Dominio catalítico, alfa amilasa, alfa, alfa-phosphotrehalase	Dominio de la enzima amilasa cuya función es digerir el glucógeno
CK739385	Helicasa con dominio DEAD	Reconoce ARN y potencialmente lo desnaturaliza, participan en aspectos variados de metabolismo de ARN, tales como splicing
CK572488	DNA helicasa, putativa	Enzima cuya función es desenrollar ADN de doble cadena

El análisis bioinformático determinó que algunos de los genes evaluados podrían presentar funciones importantes para la respuesta inmunitaria del

camarón *L. vannamei* porque muchos de ellos poseen dominios similares a genes que intervienen en la función inmune de otros organismos. Además al analizar los dominios funcionales, se encontró que ciertos genes probablemente pertenecen a grupos de proteínas con funciones similares.

El primer grupo encontrado son las chaperonas Hsp 40, Hsp 70 y chaperoninas, proteínas que se encuentran presentes en todas las células, ayudan al plegamiento, ensamblaje y transporte celular de otras proteínas (Snutch *et al.*, 1988, Feder & Hofmann 1999; Parsell & Lindquist 1993; Zugel & Kaufmann 1999; Jayakumar *et al.*, 2001).

Otro grupo encontrado son las proteasas como Catepsina D, peptidasa cisteína (C1A), proteosoma C terminal y peptidasa M20/M25/M40 cuya función es la digestión molecular y la reducción de proteínas no deseadas (Southan *et al.*, 2001; Wolf *et al.*, 2003; Barrett *et al.*, 2003). Asimismo se encontraron las peroxirredoxinas, tiorredoxinas y peroxidases, importantes en la reducción de los peróxidos tóxicos para la célula (Hall *et al.*, 2009).

3.3 Fenotipos asociados con genes candidatos en animales desafiados con WSSV.

En esta investigación se definieron cuatro fenotipos (Figura 8) en base a la mortalidad en grupos de animales tratados con diferentes dsRNAs, y monitoreados en el transcurso de 21 días que duraba cada desafío.

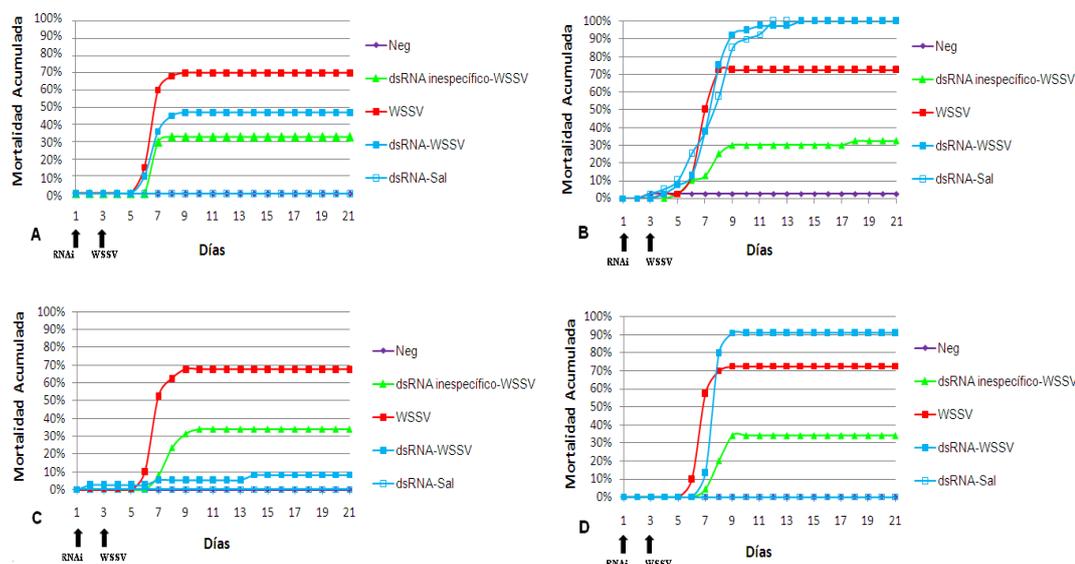


Figura 8: Cuatro fenotipos predecibles en ensayos de susceptibilidad con WSSV. La interpretación de las curvas de supervivencia se describe en mayor detalle en el texto.

A. Fenotipo no determinado: En caso de que la expresión del gen candidato no influya en la supervivencia de animales, ya sea en presencia o ausencia de infección con WSSV, se espera observar resultados similares a la Figura 8-A. En este caso, la mortalidad de animales inyectados con dsRNA contra el gen de interés es similar a la mortalidad en animales inyectados con dsRNA inespecífico, en presencia de WSSV. De igual forma, la inyección del dsRNA contra el gen de interés no causa mortalidad significativa en ausencia de infección. En resumen, reportamos ausencia de fenotipo cuando tanto en presencia como ausencia del virus, la mortalidad en animales en los cuales se asume que la expresión del gen de interés ha sido bloqueada es similar a la mortalidad en los controles respectivos. Cabe recalcar que esta interpretación, al igual que todas las interpretaciones fenotípicas presentadas

en el presente trabajo, presume el bloqueo exitoso de la expresión del gen de interés. Dicho bloqueo, sin embargo, no ha sido confirmado en ninguno de los casos presentados.

B. Gen esencial: En este fenotipo, la inyección de dsRNA contra el gen de interés causa mortalidad significativa aun en ausencia de infección viral (Figura 8-B). Desde el punto de vista estadístico, la mortalidad en estos animales es mayor a la observada en animales del control negativo no infectados. En estos casos, la posible función antiviral del gen de interés no puede ser evaluada utilizando el sistema de infección experimental, puesto que la mortalidad atribuible a WSSV no puede ser diferenciada de la mortalidad atribuible a la función esencial del gen.

C. Gen pro-viral: En este fenotipo la mortalidad observada al bloquear el gen e infectar con WSSV es significativamente menor a la mortalidad en animales tratados con dsRNA inespecífico e infectados con WSSV. En este caso, bloquear el gen causa que los animales sobrevivan mejor a la infección viral. Este resultado indicaría que bajo condiciones normales, la expresión de este gen juega un papel en el ciclo infeccioso o en la patogénesis del virus. Dicho fenotipo no es inesperado, ya que el carácter de parásito intracelular obligado de los virus implica la utilización de factores del hospedero para completar su ciclo de vida. (Figura 8-C).

D. Gen anti-viral: Este fenotipo se caracteriza por un incremento significativo en la mortalidad en animales inyectados con dsRNA específico contra el gen de interés, posterior a la infección con WSSV (Figura 8-D). Esta mortalidad es estadísticamente mayor a la observada en animales infectados y tratados con dsRNA inespecífico. Además, como pre-requisito para atribuir este fenotipo a un gen en particular, la inyección del dsRNA específico no debe causar mortalidad significativa en animales no infectados.

Para determinar los fenotipos de los genes evaluados, se aplicó el análisis estadístico de acuerdo a la Mortalidad acumulada como indica el siguiente flujograma.

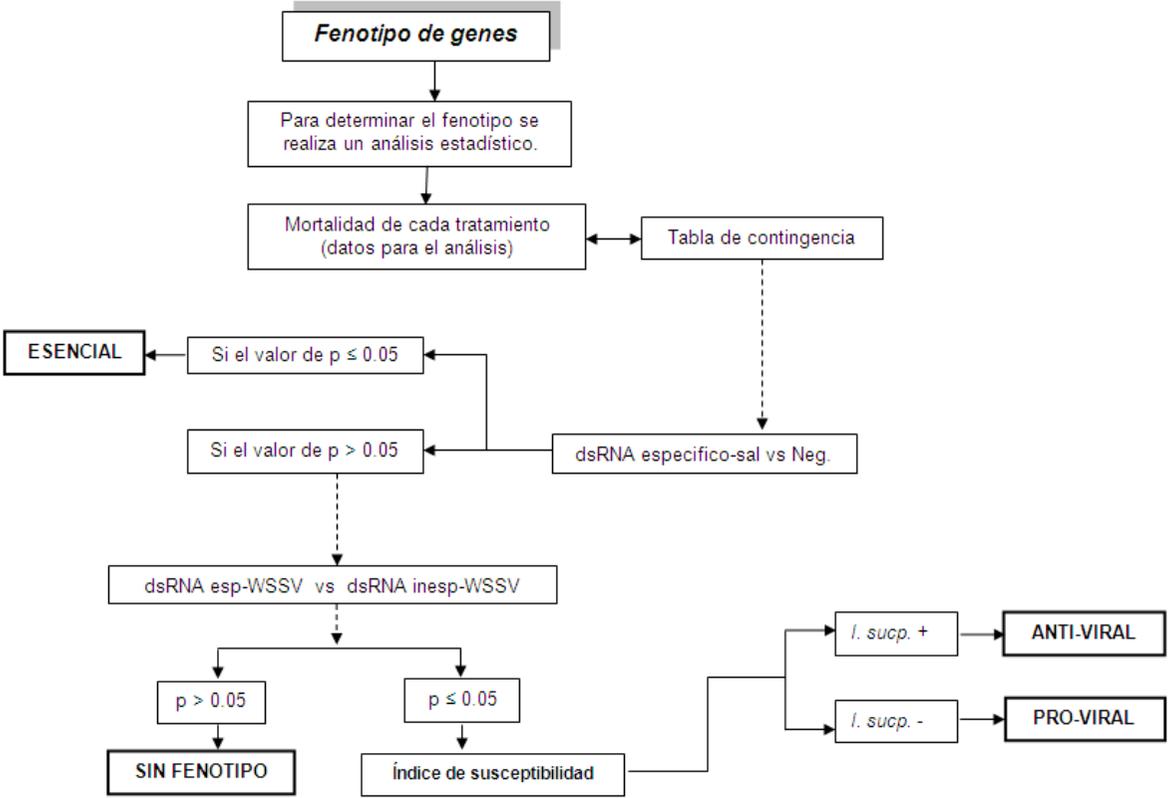


Figura 9: Diagrama de flujo del análisis estadístico aplicado para determinar los fenotipos de cada uno de los 54 genes evaluados

La Tabla ii resume los resultados obtenidos para los 54 genes evaluados en este estudio, considerando el análisis bioinformático (*i.e.*, NCBI, Cap 3 y Expsy) y estadístico (Tablas de contingencia, índice de susceptibilidad).

Tabla ii. Fenotipos observados en 54 genes evaluados.

¹ Acceso en NCBI correspondiente a la secuencia del clon inicial utilizado en las pruebas de expresión con chips de cDNA.

² Dominios funcionales detectados utilizando BLAST en el producto de traducción más probable codificado en el contig final ensamblado con CAP3.

³ Tratamientos comparados para determinar el tipo de fenotipo. **dsRNA-sal**: ARN doble cadena homólogo al gen de estudio con solución salina. **Neg**: solución salina estéril. **dsRNA-WSSV**: ARN doble cadena homólogo al gen de estudio con virus. **S114, 95114-WSSV**: ARN de doble cadena inespecífico con virus.

⁴ Valores de p y χ^2 obtenidos de tablas de contingencia.

⁵ Porcentaje de mortalidad acumulada hasta el día 21 de animales tratados con dsRNA-sal.

⁶ Porcentaje de mortalidad acumulada hasta el día 21 de animales tratados con dsRNA-WSSV.

⁷ Fenotipo observado (para mayor detalles ver el texto).

*Índice de susceptibilidad que determina el fenotipo (para mayor detalle ver el flujograma).

NA = no aplicable. Una vez que la mortalidad causada por el bloqueo del gen en ausencia de infección se determina como significativa, el gen se clasifica como esencial.

Nº de Acceso del est en NCBI ¹	Nombre ²	Tratamientos comparados ³	Tabla de contingencia ⁴		% Mortalidad Acumulada dsRNA-Sal ⁵	% Mortalidad Acumulada dsRNA-WSSV ⁶	Fenotipo Observado ⁷
			P	χ^2			
CK725277	Ldla, CLECT lectina tipo C	dsRNA-Sal vs Neg	< 0,0001	28,81	60%	78%	Esencial
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	NA	NA			
CK570744	Granulinas	dsRNA-Sal vs Neg	< 0,0001	30,78	55%	63%	Esencial
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	NA	NA			

CK572129	Proteínas de choque térmicoHsp70	dsRNA-Sal vs Neg	<0,0001	32,92	67%	64%	Esencial
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	NA	NA			
CK571978	Chaperonas	dsRNA-Sal vs Neg	<0,0001	46,88	78%	79%	Esencial
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	NA	NA			
CK571943	Tiolasa	dsRNA-Sal vs Neg	0,5412	0,37	5%	33%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,6987	0,15			
CK571718	Vigilin	dsRNA-Sal vs Neg	0,003	8,82	26%	50%	Esencial
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	NA	NA			
CK570770	DnaJ o J-DnaJ/Hsp40	dsRNA-Sal vs Neg	0,0209	5,33	13%	15%	Esencial
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	NA	NA			
CK591675	Dominio de unión al ARN	dsRNA-Sal vs Neg	0,9104	0,01	0%	13%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,8911	0,02			
CK591701	Cofactor para el doblamiento de tubulina	dsRNA-Sal vs Neg	0,9104	0,01	0%	10%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,8075	0,06			
CK571271	Peroxidasa	dsRNA-Sal vs Neg	0,2886	1,13	6%	13%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,8584	0,03			
CK572639	WD40	dsRNA-Sal vs Neg	0,001	10,71	24%	41%	Esencial
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	NA	NA			
CK572760	Catepsina D	dsRNA-Sal vs Neg	0,1362	2,22	5%	8%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,5322	0,39			
CV133220	TB2/DP1 Familia HVA22	dsRNA-Sal vs Neg	0,3143	1,01	3%	8%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,58	0,31			

CK591002	Acetil-CoA-Crotonasa/enoil-coenzima A (CoA)	dsRNA-Sal vs Neg	0,3081	1,04	3%	11%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,8674	0,03			
CK571807	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	dsRNA-Sal vs Neg	0,0002	13,65	40%	53%	Esencial
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	NA	NA			
CK725515	Peptidasa C1A	dsRNA-Sal vs Neg	0,5714	0,32	3%	8%	* <i>I.Sucp.</i> = -0.38
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,0069	7,3			pro-viral
CK743206	ATP sintasa subunidad C	dsRNA-Sal vs Neg	<0,0001	59,98	90%	92%	Esencial
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	NA	NA			
CK591327	sin dominio funcional	dsRNA-Sal vs Neg	0,556	0,35	3%	23%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,2796	1,17			
CK591655	sin dominio funcional	dsRNA-Sal vs Neg	0,1519	2,05	0%	20%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,1573	2			
CK571502	Familia Peptidasa (M20, M25 y M40)	dsRNA-Sal vs Neg	0,556	0,35	3%	25%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,3726	0,80			
CK592593	Peroxirredoxinas, thiorredoxinas	dsRNA-Sal vs Neg	0,1572	2	0%	15%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,0554	3,67			
MGID515874	sin dominio funcional	dsRNA-Sal vs Neg	0,0022	9,38	21%	43%	Esencial
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	NA	NA			
CK572962	Dominios relacionados con el fibrinógeno	dsRNA-Sal vs Neg	0,3143	1,01	3%	38%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,4228	0,64			

CK572496	Factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGF; Factor de crecimiento endotelial vascular VEGF	dsRNA-Sal vs Neg	0,0007	11,43	25%	45%	Esencial
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	NA	NA			
CK725284	sin dominio funcional	dsRNA-Sal vs Neg	0,3081	1,04	3%	48%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,9801	$6,2 \times 10^{-4}$			
CK572442	sin dominio funcional	dsRNA-Sal vs Neg	>0,9999	0	0%	40%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,5456	0,37			
MGID515663	sin dominio funcional	dsRNA-Sal vs Neg	0,0002	14,12	30%	48%	Esencial
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	NA	NA			
CK572120	sin dominio funcional	dsRNA-Sal vs Neg	0,1521	2,05	5%	34%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,2914	1,11			
CK591121	sin dominio funcional	dsRNA-Sal vs Neg	>0,9999	0	0%	65%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,1931	1,69			
CK591644	Factor antilipolisacárido	dsRNA-Sal vs Neg	0,0015	10,14	23%	23%	Esencial
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	NA	NA			
CK571145	sin dominio funcional	dsRNA-Sal vs Neg	0,1521	2,05	5%	25%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,67	0,4123			
CK572424	sin dominio funcional	dsRNA-Sal vs Neg	0,0109	6,49	15%	44%	Esencial
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	NA	NA			
CK990141	sin dominio funcional	dsRNA-Sal vs Neg	0,9104	0,01	0%	18%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	>0,9999	0			

CK572416	sin dominio funcional	dsRNA-Sal vs Neg	>0,9999	0	0%	20%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	8,68	0,08			
CK571262	sin dominio funcional	dsRNA-Sal vs Neg	0,9104	0,01	0%	35%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,0753	3,16			
CK571457	sin dominio funcional	dsRNA-Sal vs Neg	>0,9999	0	0%	23%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,5762	0,31			
CK572105	sin dominio funcional	dsRNA-Sal vs Neg	0,6464	0,21	0%	35%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,0753	3,16			
CV468236	Sar1 Ras-Like GTPasa	dsRNA-Sal vs Neg	<0,0001	76,1	100%	100%	Esencial
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	NA	NA			
CV468320	Peptidasa C1A	dsRNA-Sal vs Neg	>0,9999	0	3%	18%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,1213	2,4			
CK572708	ATPasa	dsRNA-Sal vs Neg	0,1659	1,92	10%	30%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,8094	0,06			
CK571517	Cadherinas	dsRNA-Sal vs Neg	0,9855	3,3x10 ⁻⁴	3%	18%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,1213	2,4			
CK592250	Ribosomal L7Ae	dsRNA-Sal vs Neg	0,1659	1,92	10%	18%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,1213	2,4			
CV468393	Mesd	dsRNA-Sal vs Neg	>0,9999	0	3%	28%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,6256	0,24			

CK572677	Dominio SWIB MDM2	dsRNA-Sal vs Neg	0,5412	0,37	5%	28%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,3936	0,73			
CK591233	Dominio SWIB MDM3	dsRNA-Sal vs Neg	0,1659	1,92	10%	38%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,0838	2,99			
MGID514847	Histona de unión RBBP4 o subunidad C de complejos CAF1	dsRNA-Sal vs Neg	<0,0001	64,96	93%	88%	Esencial
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	NA	NA			
CK591012	Inositol polifosfato quinasa	dsRNA-Sal vs Neg	0,1569	2	10%	23%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,7393	0,11			
CV468041	Factor de iniciación eucariótico	dsRNA-Sal vs Neg	<0,0001	46,88	85%	80%	Esencial
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	NA	NA			
CK571791	Proteínas transportadoras	dsRNA-Sal vs Neg	0,0253	5	18%	36%	Esencial
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	NA	NA			
MGID513560	Proteosona C-terminal de la subunidad reguladora	dsRNA-Sal vs Neg	<0,0001	76,1	100%	100%	Esencial
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	NA	NA			
CK571864	sin dominio funcional	dsRNA-Sal vs Neg	<0,0001	64,96	93%	95%	Esencial
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	NA	NA			
CK591345	Dominio catalítico, alfa amilasa, alfa, alfa-phosphotrehalase	dsRNA-Sal vs Neg	0,3049	1,05	8%	18%	sin fenotipo
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	0,4123	0,67			
CK739385	Helicasa con dominio DEAD	dsRNA-Sal vs Neg	<0,0001	59,91	91%	100%	Esencial
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	NA	NA			
CK572488	ADN helicasa putativa	dsRNA-Sal vs Neg	<0,0001	16,62	41%	45%	Esencial
		dsRNA-WSSV vs dsRNA inespecifico-WSSV	NA	NA			

CAPITULO 4

4. DISCUSIÓN

Ecuador es uno de los principales exportadores de camarón blanco *L. vannamei* a nivel mundial según fuentes de la Cámara Nacional de Acuicultura del Ecuador. Esto se ha logrado en las últimas dos décadas mediante el uso de tecnología que ha sustentado el incremento de su producción. Las condiciones generadas por este incremento tales como densidades de siembra elevadas, cambios de condiciones ambientales, diferentes estrategias de manejo, etc. han estado acompañadas de un aumento en la incidencia de enfermedades infecciosas, asociadas con agentes bacterianos y virales (e.g., WSSV, TSV, IHNV, BP, YHV, IMNV).

El Síndrome de la mancha blanca fue una enfermedad que afectó en forma drástica la producción de camarones en Ecuador. Esta enfermedad tiene como agente etiológico al virus de la mancha blanca, el cual pertenece a la familia Nimaviridae (Van Hulten & Vlak 2001, Yang *et al.*, 2001). La infección aguda provocada por este virus puede producir hasta el 100% de mortalidad en los cultivos comerciales de camarón (Sahul *et al.*, 2001). Este hecho obligó a que se desarrollen estrategias de mitigación para tratar de disminuir el impacto de esta enfermedad a nivel de producción. Algunas de estas estrategias (*e.g.*, tratamientos de hipertermia, control de calidad de agua, inmunoestimulantes, comprar larvas certificadas SPF, siembras a bajas densidades, manejos de suelos (zonas negras), controles semanales y monitoreo de sanidad) fueron parcialmente exitosas para el control de la enfermedad.

Por su alto grado de virulencia, el WSSV ha sido utilizado como un modelo de estudio, especialmente en lo que concierne a respuestas antivirales en Peneidos (Robalino *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2008). El camarón posee genes que son regulados a nivel de la transcripción luego de una infección por WSSV, (Gross *et al.*, 2001; Robalino *et al.*, 2007). A fin de estudiar el efecto de estos genes luego de una infección provocada por WSSV, estudios de genética inversa son necesarios.

El presente trabajo se planteó como principal objetivo la identificación de genes antivirales, es decir genes del camarón cuya función fuese importante

para la respuesta inmune antiviral. La estrategia experimental consistió en bloquear la expresión de genes candidatos mediante la inyección de ARN de doble cadena (dsRNA), previo a la infección con dosis controladas de WSSV. La introducción de dsRNA con secuencia homóloga a un gen provoca la reducción en la expresión de dicho gen, mediante un fenómeno conocido como ARN de interferencia (*i.e.*, ARNi) (Hammond *et al.*, 2001; McManus & Sharp, 2002).

Para cada gen estudiado se realizaron pruebas estadísticas comparando la supervivencia del grupo de animales inyectado con dsRNA homólogo al gen de estudio-solución salina versus Negativo (grupo control de animales sin infectar, inyectados con solución salina). Esto permitió evaluar, en primera instancia, si el efecto del silenciamiento del gen interfiere en la supervivencia de los animales (en ausencia de la infección artificial con WSSV) bajo las condiciones experimentales utilizadas. Este primer análisis permitió descartar como posibles genes antivirales aquellos cuya expresión es esencial para la supervivencia de los camarones en general. Se identificaron el 41% de genes con fenotipo esencial (ver Tabla ii), cuyo bloqueo causó altos niveles de mortalidad, en ausencia de infección.

Esta observación podría significar que muchos genes cuya expresión aumenta en respuesta a un estímulo inmunitario promueven la capacidad del

animal para sobrevivir durante situaciones de estrés (los genes candidatos fueron seleccionados por responder a la inyección de dsRNA, un estímulo antiviral en camarones) (Robalino *et al.*, 2004).

Futuros estudios serán necesarios para explorar esta hipótesis, comparando los efectos de bloquear dichos genes y someter a los animales a diferentes fuentes de estrés (*e.g.* bajo oxígeno disuelto, cambios de temperatura, etc.). Las funciones de algunos de estos genes, predecibles en base al análisis bioinformático realizado (Tablas 1 y 2), concuerda con roles en el control a situaciones de estrés y en el plegamiento de un gran número de otras proteínas. Ejemplos incluyen las chaperonas, tales como Hsp40 y Hsp70 (Snutch *et al.*, 1988; Cyr *et al.*, 1992; Feder & Hofmann 1999; Parsell & Lindquist 1993; Zugel & Kaufmann 1999; Jayakumar *et al.*, 2001). Probablemente la falta de expresión de estos genes sería la causa de mortalidad presentada en este estudio.

El 59% del total de genes evaluados que no presentaron fenotipo esencial, para los cuales el bloqueo en ausencia de infección viral no resultó en un efecto significativo en términos de supervivencia, fueron analizados como posibles genes antivirales; de igual forma se comparó la supervivencia de animales inyectados con cada dsRNA específico e infectados con WSSV

versus la supervivencia de animales inyectados con dsRNA inespecífico e infectados con el virus.

De estos genes el 58% no mostraron fenotipo alguno, es decir, no se detectaron diferencias significativas en la mortalidad causada por WSSV entre animales inyectados con dsRNA inespecífico y aquellos inyectados con dsRNA específicos. Estos resultados sugieren que cada uno de estos genes, individualmente, son dispensables para la respuesta del camarón contra WSSV.

Una posible falencia en esta interpretación es que cabe la posibilidad que en el caso de estos genes la inyección con dsRNA no es capaz de eficazmente bloquear su expresión. Es posible que algunos genes sean resistentes al ARNi, por la presencia de factores estabilizantes del ARN mensajero, u otros fenómenos aun desconocidos. En efecto, hay casos documentados de proteínas que inhiben el bloqueo via ARNi mediante interacción directa con ARN mensajeros (Bhattacharyya *et al.*, 2006; Kedde *et al.*, 2007).

De los 54 genes estudiados el 2% presentó fenotipo pro viral. El bloqueo de su expresión parece estar asociado con un nivel de protección contra WSSV superior a lo que proporcionó la inyección de un dsRNA inespecífico. El gen

potencialmente bloqueado con el dsRNA utilizado codifica una proteasa representada en el clon CK725515.

El resultado observado para este gen sugiere que la función de esta proteasa sería importante para el ciclo infeccioso y/o la patogénesis del WSSV. Los posibles mecanismos son variados: una posibilidad es que esta proteasa participe en la maduración proteolítica de proteínas virales, ya sean éstas estructurales o no estructurales. Otra posible explicación para este fenómeno es que la proteasa pro-viral (codificada por el hospedero) sea responsable de causar muerte celular en situaciones de infección con WSSV, y al inhibir su acción, exista una mayor viabilidad celular, reflejada en una mayor supervivencia en animales infectados.

Estas son sólo dos de las múltiples interpretaciones posibles para la mayor supervivencia observada al bloquear la expresión de CK725515. Alternativamente, es posible que esta proteasa regule negativamente algún mecanismo antiviral, y por lo tanto su silenciamiento resulte en una respuesta antiviral aumentada.

Estudios futuros serán necesarios para comprobar el fenotipo observado, y para determinar el posible rol de este gen en la interacción entre WSSV y el hospedero.

Encontrar genes antivirales tiene aplicación en la selección de camarones más resistentes, en los cuales genes involucrados en la respuesta inmune antiviral tengan mayor nivel de expresión (*i.e.*, marcadores de respuesta inmune). Es posible además realizar estudios tendientes a identificar tratamientos que promuevan la expresión de estos genes, por ejemplo aplicando a los camarones diferentes inmunoestimulantes que puedan inducir su expresión. Es importante realizar selección de animales más resistentes a través de mecanismos de genes antivirales, esto permitirá desarrollar prácticas de manejo que apoyen al mejoramiento de salud animal.

CONCLUSIONES

1. El silenciamiento con dsRNA (ARNi) representa un método promisorio para la evaluación funcional de genes candidatos, posiblemente involucrados en procesos de interés en acuicultura, tales como resistencia a enfermedades, crecimiento, y otros. Considerando la abundancia de secuencias actualmente disponibles en bases de datos públicas.
2. En base a las mortalidades presentadas en el análisis estadístico de los 54 genes evaluados no se evidenció la presencia genes antivirales.
3. Los fenotipos encontrados en este estudio fueron: genes esenciales, pro-virales y sin fenotipo.

RECOMENDACIONES

1. En base a los resultados, se recomienda realizar más bioensayos en busca de genes antivirales en *L. vannamei* realizando réplicas para cada tratamiento.
2. Confirmar los fenotipos identificados en este y en futuros trabajos mediante la cuantificación de los niveles de ARN de los genes bloqueados.
3. Realizar análisis a nivel histológico de animales que presentaron alta mortalidad en ausencia de WSSV (fenotipo esencial), con el fin de determinar posibles cambios histopatológicos asociados con el bloqueo de genes involucrados en la homeostasis o el control del estrés, que aportaría significativamente al conocimiento de la biología de *L. vannamei*.

ANEXOS

ANEXO A

INICIADORES UNIVERSALES USADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL INSERTO DE ADN DE LOS DIFERENTES CLONES.

Iniciadores o Primers universales

-T3 (G-3457 ó 1954)

5'-GAA TTA ACC CTC ACT AAA GGG ATC GAG CGG CCG CCC GGG CAG GT-3'

-T7 (G-3458 ó 1955)

3'-G TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GAG CGT GGT CGC GGC CGA GGT-5'

-T3 (G-3460 ó 2929)

5'- GAA TTA ACC CTC ACT AAA GGG ACT CGG GAA GCG CGC CAT TGT G-3'

-T7 (G-3458 ó 2930)

3'-G TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GCG AAT TGG CCA AGT GAG CTC G-5'

-M13 Rev

5'-GGA AACAGCTATGACCATGA-3'

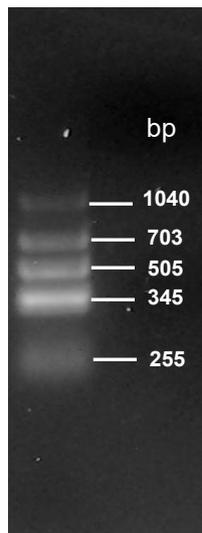
-M13 Fw

3'-GTAAAACGACGGCCAGTG-5'

ANEXO B

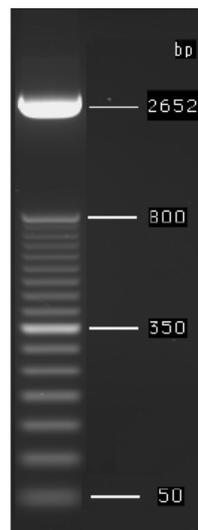
MARCADORES DE PESO MOLECULAR USADOS PARA DETERMINAR EL TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS

MARCADOR DE PESO MOLECULAR CASERO



MARCADOR DE PESO MOLECULAR COMERCIAL (50 bp DNA Ladder

Invitrogen)



ANEXO C

PROTOCOLO DE RECAMBIO DE AGUA DEL BIOENSAYO

Procedimientos de ingreso a la sala de experimentación

1. Al llegar quitarse los zapatos personales, colocarse la ropa de desafío que está colgada en el interior junto a la entrada, manteniéndose de pie en el exterior del laboratorio.
2. Entrar colocarse las botas en el pediluvio
3. Desinfectarse las manos con el atomizador de etanol una vez en el interior del laboratorio. Es imprescindible desinfectarse las manos antes de comenzar a trabajar.

Preparación de agua para recambio

4. Abrir válvula de agua salada, y dejar correr el agua por 10 min.
5. Desinfectar con alcohol el extremo de la manguera, luego llenar el tanque con aproximadamente 200l de agua salada.
6. Agregar 40 ml de cloro, mezclar y dejar actuar con aireación hasta el día siguiente.
7. Transcurrido este tiempo, neutralizar el agua con 3 g de tiosulfato de sodio (homogenizar bien). Es imprescindible disolver el tiosulfato en un volumen pequeño de agua, luego añadirlo y mezclarlo.

8. Confirmar que no hay residuo de cloro con Orto-iodine. La coloración del agua debe ser totalmente transparente.

Procedimiento antes de comenzar el recambio

9. Asegurarse de tener desinfectadas las manos con alcohol
10. Chequear que hay suficiente agua para todos los tratamientos
11. Oxigenar el agua del reservorio por 10 min
12. Abrir la llave del reservorio, dejar correr el agua por 5 segundos antes de llenar el tanque de recambio.
13. Llenar el tanque de recambio
14. Preparar las tinas de recambio.

IMPORTANTE: Todas las tinas donde se deposita el agua desechada del recambio, se consideran contaminados.
15. Desinfectar con cloro al 10% el área de recambio.

Recambio de agua de los sistemas individuales de desafío

16. Desinfectarse las manos con alcohol.
17. Descartar el agua de los recipientes, empezando por los tratamientos que sólo tienen solución salina.
18. Colocar el agua salada previamente tratada y alimentar con una pequeña cantidad de alimento comercial para camarones.

19.Desinfectar el área de recambio con cloro al 10% y alcohol antes de empezar cada tratamiento.

20.Cambiarse de guantes

21.Finalmente empezar el recambio de los tratamientos con WSSV, de igual forma como se hizo con los tratamientos que contienen solución salina.

Procedimientos diarios en la sala de experimentación

22.Descartar el agua del recambio del día anterior

- a. Desinfectar las tinas de recambio añadiendo 20 ml de cloro.
- b. Mezclar bien y dejar reposar al menos 1 hora.
- c. Neutralizar el agua con 2 gr de tiosulfato.
- d. Descartar el agua en el drenaje.
- e. Recoger los animales muertos para ser esterilizados en el autoclave posteriormente.

23.Cambiar el agua en el pediluvio de la entrada

- a. Colocar 20 litros de agua con 20 ml de cloro.

24.Asegurarse que haya agua preparada para el recambio del día siguiente.

Procedimientos de salida de la sala de experimentación

- 25.** Quitarse las botas destinadas para el área de desafío y dejarlas en el pediluvio.

- 26.** Salir de la sala y quitarse la ropa de desafío; dejar colgada la ropa en el interior junto a la entrada.

- 27.** Desinfectarse las manos con alcohol.

- 28.** Colocarse la ropa y zapatos personales.

ANEXO D

Tabla iii. Análisis Bioinformático de 54 genes Evaluados

¹ Numero de Clon

² Acceso en NCBI correspondiente a la secuencia del clon inicial utilizado en las pruebas de expresión con chips de cDNA.

³ Total EST's de nucleotide blast en NCBI usados para reconstruir el contig

⁴ Valor de expect: valor estadístico que indica el nivel de similitud entre los EST's evaluados. Valores cercanos a 0 indican una mayor similitud con la secuencia

⁵ Hit blastx: Producto de traducción en NCBI con mayor similitud al contig reconstruido.

⁶ Dominios funcionales detectados utilizando BLAST en el producto de traducción más probable codificado en el contig final ensamblado con CAP3.

¹ Nº de clon	² Nº de Acceso del EST's en NCBI	³ Total est (nucleotide blast-NCBI)	⁴ Valor de Expect (<10 ⁻⁶)	⁵ Hit blastx	⁶ Dominio Funcional	⁷ Descripción
604	CK725277	12 est de ADNc	2,00E-09	Lectina tipo C [<i>Litopenaeus vannamei</i>]	LDLa , CLECT lectina tipo C	LDLa: ricos en la lipoproteína de baja densidad (LDL) que juega un papel central en el metabolismo del colesterol de los mamíferos. CLECT: se unen las lipoproteínas, proteínas, lípidos, y las superficies inorgánicas, incluyendo CaCO ₃ y el hielo. Lectinas de animales tipo C están implicadas en funciones como: organización de la matriz extracelular, la endocitosis, la activación del complemento, el reconocimiento de patógenos, y las interacciones célula-célula.
594	CK570744	12 est de ADNc	4,00E-36	Proteina hipotética [<i>Ciona intestinalis</i>]	Granulinas	Familia de péptidos ricos en cisteina; están relacionados con la evolución de un PMP-D1, un péptido extraído de la parte intercerebral de langostas migratorias.

2487	CK572129	25 est de ADNc	0	Proteina de choque termico 70 [<i>Litopenaeus vannamei</i>]	Hsp70	Proteínas de choque térmico (Hsp): chaperonas Hsp70 ayudan a veces muchas proteínas. Algunas de estas sólo se expresan bajo condiciones de estrés (en sentido estricto inducible), mientras que algunos están presentes en las células en condiciones de crecimiento normales y no están al calor inducible (constitutiva o afines). Algunas proteínas HSP70 son esenciales para la viabilidad celular, están implicadas en el movimiento de proteínas en y a través de diversos compartimientos de la célula eucariota.
2259	CK571978	37 est de ADNc	0	Chaperoninas [<i>Aedes aegypti</i>]	Chaperoninas	Están involucrados en el plegamiento de las proteínas productiva. Su función común es la de retener las proteínas no nativas en el interior de su cavidad central y promover el plegado utilizando la energía derivada de la hidrólisis del ATP.
2209	CK571943	16 est de ADNc	1,00E-136	GA18290 [<i>Drosophila pseudoobscura pseudoobscura</i>]	Tiolasa	Son enzimas ubicuas que catalizan la escisión tiolítica reversible de 3-cetoacil-CoA en acil-CoA y acetil-CoA. Se encuentran en procarionotas y eucariotas (citósol y las mitocondrias microcuerpos).
1799	CK571718	4 est de ADNc	1,00E-170	similar a Dodeca-satellite-binding protein 1 CG5170-PC, isoform C [<i>Apis mellifera</i>]	Vigilin	KH se une una sola cadena de ARN o ADN. Se encuentra en una amplia variedad de proteínas, incluyendo las proteínas ribosomales, factores de transcripción y modificadores de post-transcripcional del mRNA.
630	CK570770	1 est de ADNc	sin hit blastx	Sin hit blastx	DnaJ o J-. DnaJ/Hsp40	Son altamente conservados y juegan un papel crucial en la traducción de la proteína, abriendo, cerrando, en la translocación, y la degradación. Ellos actúan principalmente estimulando la actividad de la ATPasa de Hsp70s, una familia chaperoninas importante. proteínas Hsp40 se caracterizan por la presencia de un dominio J, que media la interacción con Hsp70.

6928	CK591675	38 est de ADNc	2,00E-56	Proteína Hipotética TcasGA2_TC012868 [<i>Tribolium castaneum</i>]	RRM	También conocido como RBD (dominio de unión al ARN) o RNP (ribonucleoproteína), es un dominio muy abundante en las células eucariotas se encuentran en las proteínas implicadas en la expresión génica post-transcripcional del mRNA y procesos que incluyen procesamiento de rRNA, la exportación de ARN, y la estabilidad del ARN. RRM generalmente interactúa con ssARN, pero también se sabe que interactúan con ADN de cadena simple, así como las proteínas.
6985	CK591701	8 est de ADNc	4,00E-25	Tubulinas plegables Cofactor C [<i>Aedes aegypti</i>]	Cofactor para el doblamiento de tubulina	Los miembros de esta familia están involucrados en el proceso de plegamiento de tubulinas y forman una hélice beta.
1173	CK571271	16 est de ADNc	5,00E-146	Peroxinectin [<i>Fenneropenaeus chinensis</i>]	Peroxidasas	Peroxidasas son enzimas que contienen grupo hemo que usa el peróxido de hidrógeno como receptor de electrones para catalizar una serie de reacciones de oxidación.
6063	CK572639	100 est de ADNc	0	Receptor de la proteína quinasa activada C 1(Rack1) [<i>Penaeus monodon</i>]	WD40	Se encuentra en una serie de proteínas eucarióticas que cubren una amplia variedad de funciones incluyendo adaptador / módulos de regulación de la transducción de señales, el procesamiento del pre-mRNA y ensamble de citoesqueleto.
6207	CK572760	13 est ADNc	0	Catepsina D [<i>Penaeus monodon</i>]	Catepsina D	Se trata de un miembro de la familia de las proteasas pepsina. La pepsina es una de las tres principales proteínas de degradación, o proteolíticas, las enzimas en el sistema digestivo.
2937	CV133220	99 est ADNc	2,00E-45	Sin hit blastx	Sin dominio funcional	No descripción
7129	CK591002	7 est de ADNc	1,00E-48	Enoyl-CoA Hidratasa [<i>Saccoglossus kowalevskii</i>]	Acil-CoA-crotonasas / enoil-coenzima A (CoA)	Son intermediarios importantes en la síntesis de lípidos grasos y la degradación de ácidos grasos; desempeña un papel en la regulación del metabolismo intermediario y la regulación de genes.

1944	CK571807	23 est de ADNc	5e-60	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa [<i>Litopenaeus vannamei</i>]	PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK): una enzima gluconeogénica crítica, cataliza el primer paso en la gluconeogénesis hepática. Cataliza la descarboxilación reversible y la fosforilación de oxaloacetato en fosfoenolpiruvato (PEP) y el dióxido de carbono, utilizando ATP o GTP como fuente de fosfato
921	CK725515	100 est de ADNc	0	Catepsina L [<i>Penaeus monodon</i>]	Peptidasa C1A	La subfamilyPeptidase C1A está compuesto por peptidasas cisteína (CPs), similar a la papaína, incluido el CPs de mamíferos. La mayoría de los miembros de la subfamilia papaína son endopeptidasas. Son responsables de la degradación de proteínas en el lisosoma.
1492	CK743206	64 est de ADNc	1,00E-53	GJ24692 [<i>Drosophila virilis</i>]	ATP-sintasa C	ATP sintasa subunidad C: La principal función V-ATPasas son la acidificación de los compartimentos intracelular de las células eucariotas. ATPasas (o ATP sintasa) son complejos enzimáticos de membrana o transportadores de iones que combinan la síntesis de ATP y / o hidrólisis con el transporte de protones a través de una membrana.
7569	CK591327	5 est de ADNc	>10 ⁻⁶	No descripcion	Sin dominio funcional	No descripción
6851	CK591655	5 est de ADNc	4e-37	Polinucleótido 5'quinasa 3' fosfatasa [<i>Culex quinquefasciatus</i>]	Sin dominio funcional	No descripción
1471	CK571502	18 est de ADNc	2,00E-104	Citosol inespecíficos dipeptidasa [<i>Lepeophtheirus salmonis</i>]	Familia Peptidasa M20/M25/M40	Las peptidasas (antes conocidas como proteasas) son enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas.Estas enzimas están implicadas en una multitud de reacciones fisiológicas desde la simple digestión de las proteínas de los alimentos hasta cascadas altamente reguladas (ejm.: cascada de coagulación sanguínea, el sistema del complemento, vías de la apoptosis y la cascada que activa la Profenoloxidasa del invertebrado).

9169	CK592593	100 est de ADNc	1,00E-97	Glutación peroxidasa [<i>Scylla serrata</i>]	Peroxirredoxina (PRX_1cys), Tiorredoxina , Reductasa hidroperóxido de alquilo (AhpC)	Peroxirredoxinas: familia de enzimas antioxidantes que controlan los niveles de citoquinas inducida por peróxido y en consecuencia, median la transducción de señales en las células de los mamíferos. La peroxirredoxina II es una de las proteínas más abundante en los eritrocitos después de la hemoglobina. Tiorredoxina: Funcionan como oxidorreductasas disulfuro de proteínas (DOP), alterando el estado redox de proteínas diana a través de la oxidación reversible de su sitio activo ditiol. AhpC: es responsable de la reducción hiperóxidos orgánicos en su forma reducida de ditiol.
5358	MGID515874	16 est de ADNc	Sin hit blastx	Sin hit blastx	Sin domino funcional	No descripción
6628	CK572962	8 est de ADNc	4,00E-22	Proteína predecible [<i>Nematostella vectensis</i>]	Dominios relacionados con el fibrinógeno (Fred)	El fibrinógeno es una proteína soluble del plasma sanguíneo precursor de la fibrina, está involucrado en la coagulación sanguínea.
5787	CK572496	26 est de ADNc	9,00E-14	Proteína Hipotetica TcasGA2_TC008148 [<i>Tribolium castaneum</i>]	Factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGF;Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	PDGF: es uno de los numerosos factores de crecimiento, o proteínas que regulan el crecimiento celular y la división celular, desempeña un rol en el desarrollo embrionógico, proliferación celular, migración celular y angiogénesis. VEGF: es un potente inductor de la formación de vasos sanguíneos durante el desarrollo embrionario (vasculogénesis), realizan su función en las células diana a través de tres receptores con actividad tirosina kinasa intrínseca: VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3, localizados en células endoteliales y en otros tipos celulares.
648	CK725284	19 est de ADNc	sin hit blastx	Sin hit blastx	Sin domino funcional	No descripción
5698	CK572442	48 est de ADNc	9,00E-28	Proteína hipotetica [<i>Scylla paramamosain</i>]	Sin domino funcional	No descripción

5144	MGID5156 63	100 est de AdNc	>10 ⁻⁶	>10 ⁻⁶	Sin domino funcional	No descripción
2472	CK572120	2 est de ADNc	sin hit blastx	Sin hit blastx	Sin domino funcional	No descripción
7312	CK591121	1 est de ADNc	sin hit blastx	Sin hit blastx	Sin domino funcional	No descripción
6835	CK591644	31 est de ADNc	3,00E-54	Facto anti- lipopolisacarido [<i>Litopenaeus stylirostris</i>]	Factor anti- lipopolisacárido	El factor anti-lipopolisacárido (ALF): tiene un amplio espectro de actividad contra cepas diferentes de bacterias y hongos.
1010	CK571145	10 est de ADNc	>10 ⁻⁶	>10 ⁻⁶	Sin domino funcional	No descripción
5667	CK572424	59 est de ADNc	>10 ⁻⁶	>10 ⁻⁶	Sin domino funcional	No descripción
1857	CK990141	3 est de ADNc	>10 ⁻⁶	>10 ⁻⁶	Sin domino funcional	No descripción
5653	CK572416	19 est de ADNc	sin hit Blastx	Sin hit Blastx	Sin domino funcional	No descripción
1161	CK571262	2 est de ADNc	sin hit Blastx	Sin hit Blastx	Sin domino funcional	No descripción
1415	CK571457	41 est de ADNc	>10 ⁻⁶	>10 ⁻⁶	Sin domino funcional	No descripción
2450	CK572105	2 est de ADNc	>10 ⁻⁶	>10 ⁻⁶	Sin domino funcional	No descripción

9572	CV468236	36 est de ADNc	1,00E-92	AGAP004098-PA [<i>Anopheles gambiae</i> str. PEST]	Sar1, Ras-like GTPasa.	Sar1: es un componente esencial de las capas de la vesícula COPII, relacionados con la exportación de carga desde el ER. La actividad GTPasa de Sar1 funciona como un interruptor molecular para el control de las interacciones proteína-proteína y lípido-proteína que dirige la vesícula del ER. Ras-like GTPase: La superfamilia Ras-GTPasas se compone de varias familias (el Ras, Rho, Rab y Sar1/Arf) con un alto grado de similitud estructural y funcional. Regulan una amplia variedad de funciones celulares; Ras regula la expresión genética, Rho regula la reorganización del citoesqueleto y la expresión génica, Rab y familias Sar1/Arf regulan el tráfico de vesículas, y la familia Ran regula el transporte nucleocitoplásmico y microtúbulos organización.
6084	CV468320	100 est de ADNc	0.0	Catepsina L [<i>Penaeus monodon</i>]	Peptidasa subfamilia C1A	La subfamilyPeptidase C1A está compuesto por peptidasas cisteína (CPs), similar a la papaína, incluido el CPs de mamíferos. La mayoría de los miembros de la subfamilia papaína son endopeptidasas. Son responsables de la degradación de proteínas en el lisosoma.
6148	CK572708	21 est de ADNc	3,00E- 131	AGAP001587-PA [<i>Anopheles gambiae</i> str. PEST]	ATPasa I	Esta familia se compone de la 116kDa ATPasa tipo V (vacuolar (H ⁺)-ATPasa): La familia de ATPasas tipo V son bombas de protones que acidifican compartimentos intracelulares en células eucariotas. Ellos tienen un papel importante en los procesos de tráfico de membranas. La subunidad 116kDa (subunidad a) en la V-ATPasa tipo forma parte de la V0 dominio funcional responsable del transporte de protones.

1491	CK571517	5 est de ADNc	1,00E-117	Similar to Cadherinas 88C CG3389-PA [<i>Acyrtosiphon pisum</i>]	Cadherinas	Cadherinas son glicoproteínas o moléculas de adhesión. Media la adhesión célula-célula cuando se une al Ca ²⁺ , como resultado de la interacción entre los dominios de las regiones repetidas extracelulares. Modulan una gran variedad de procesos que incluye la polarización celular y la migración.
8731	CK592250	34 est de ADNc	4,00E-42	Similar a la proteína hoip-prov [<i>Nasonia vitripennis</i>]	Ribosomal L7Ae	Los ribosomas son las partículas que catalizan la síntesis de proteínas ARNm-dirigida en todos los organismos. Los codones del ARNm se exponen en el ribosoma para permitir el ligamiento del tRNA. Esto lleva a la incorporación de aminoácidos en la cadena creciente del polipéptido de conformidad con la información genética. La estructura genómica y la secuencia de la proteína ribosomal L7A en humanos se parece a genes de la proteína ribosomal de mamíferos.
6373	CV468393	16 est de ADNc	2,00E-46	GJ20269 [<i>Drosophila virilis</i>]	Mesd	MESD es una familia de proteínas identificadas en el desarrollo del mesodermo altamente conservado y encontrado desde los nematodos hasta en seres humanos, también conocido como acompañante LDLR, son correceptores para la transducción de señales WNT canónica y esenciales para la especificación de la polaridad y la inducción embrionaria del mesodermo.
6113	CK572677	5 est de ADNc	5,00E-99	Factor asociado al brg-1, putativo [<i>Pediculus humanus corporis</i>]	Dominio SWIB MDM2	MDM2 : (de sus siglas en inglés "murine double minute 2") es un inhibidor del gen supresor tumoral p53 y actúa como una ubiquitina ligasa E3 que reconoce el dominio de trans-activación N-terminal (TAD) de la proteína p53, y también como un inhibidor de la activación transcripcional de p53.
7457	CK591233	5 est de ADNc	5,00E-99	Factor asociado al brg-1, putativo [<i>Pediculus humanus corporis</i>]	Dominio SWIB MDM2	MDM2 : (de sus siglas en inglés "murine double minute 2") es un inhibidor del gen supresor tumoral p53 y actúa como una ubiquitina ligasa E3 que reconoce el dominio de trans-activación N-terminal (TAD) de la proteína p53, y también como un inhibidor de la activación transcripcional de p53.

4297	MGID5148 47	8 est de ADNc	4,00E-134	Similar a la proteína retinoblastoma vinculante 4 isoforma 1 [<i>Canis familiaris</i>]	Histona de unión RBBP4 o subunidad C de complejos CAF1, WD40	El complejo de CAF-1 es un complejo de proteínas conservadas heterotrimérica que promueve la deposición de las histonas H3 y H4 en ADN recién sintetizado durante la replicación o la reparación del ADN. WD40: se encuentra en una serie de proteínas eucarióticas que cubren una amplia variedad de funciones incluyendo adaptador / módulos de regulación de la transducción de señales, el procesamiento del pre-mRNA y ensamble de citoesqueleto.
7146	CK591012	3 est de ADNc	2,00E-49	Proteína Hipotética TcasGA2_TC007485 [<i>Tribolium castaneum</i>]	Inositol polifosfato quinasa	Desempeñan un papel de gran importancia en los sistemas de transducción de señales.
6366	CV468041	53 est de ADNc	8,00E-51	Similar a la proteína del factor de traducción SUI1 homólogo [<i>Tribolium castaneum</i>]	Factor de iniciación eucariótico 1	El sui1/eif1 (factor de iniciación eucariótico 1) A veces se encuentra en las células eucariotas, arqueas, y algunas bacterias y se cree que juegan un papel importante en el reconocimiento del codón iniciador para la traducción. Este factor se une a la subunidad 30s solo como una parte del complejo de iniciación completo y podría estar implicado en la estabilización del complejo, más que en el reconocimiento de un componente específico.
2075	CK571791	36 est de ADNc	1,00E-85	Proteína mitocondrial transportadora de fosfato [<i>Aedes aegypti</i>]	Proteínas transportadoras	Una variedad de proteínas transportadoras de base que cambian de forma para dar paso a determinados productos; están involucradas en la transferencia de energía, se encuentran en la membrana mitocondrial interna o integral a la membrana de otras organelas eucariotas como el peroxisoma. Proteínas, tales como: ADP, ATP proteínas, proteínas portadoras (ADP / ATP translocasa); proteína transportadora 2-oxoglutarate/malate; proteína transportadora de fosfato, proteína de transporte tricarbóxilato (o citrato de proteínas de transporte), y muchos otros.

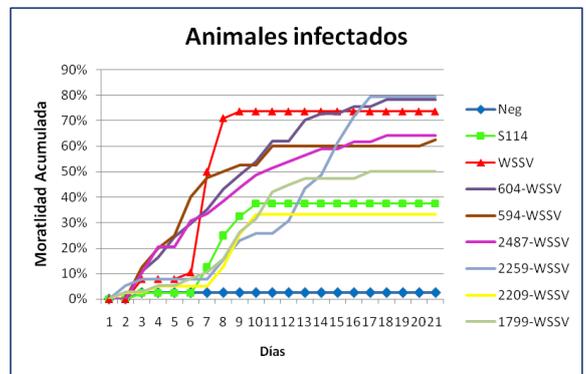
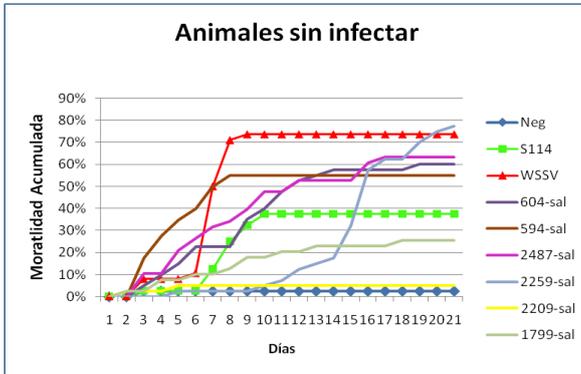
6015	MGID513560	12 est de ADNc	2,00E-55	proteasoma reguladores no-ATPasa subunidad 3 [<i>Danio rerio</i>]	Proteasoma C-terminal de la subunidad reguladora	Proteasoma C-terminal de la subunidad reguladora: Subunidad del complejo proteico encargada de la degradación de proteínas. El dominio eucariota se encuentra en el extremo C-terminal de las subunidades reguladoras 26S proteasoma como la subunidad Rpn3 no-ATPasa que es esencial para la función proteasoma.
2068	CK571864	1 est de ADNc	sin hit blastx	Sin hit blastx	Sin dominio funcional	No descripcion
7588	CK591345	33 est de ADNc	1E-26	GG24807 [<i>Drosophila erecta</i>]	Dominio catalítico, alfa amilasa, alfa, alfa-phosphotrehalase	Dominio catalítico, alfa amilasa: es una enzima digestiva importantes en el camarón <i>Penaeus vannamei</i> . La α -amilasa cataliza la hidrólisis del enlace α -1-4 de los azúcares, enzima que descompone el almidón, divide las cadenas rectas del almidón en moléculas más pequeñas. alfa, alfa-phosphotrehalase La trehalosa es un disacárido de glucosa que sirve en muchos sistemas biológicos como un soluto compatible para la protección contra el estrés hiperosmótico y térmica.
1068	CK739385	125 est de ADNc	0.0	Factor de iniciación eucariótico 4A [<i>Callinectes sapidus</i>]	Helicasa con dominio DEAD	Reconoce ARN y potencialmente lo desnaturaliza, participan en aspectos variados de metabolismo de ARN, tales como splicing.
5777	CK572488	2 est de ADNc	2,00E-12	Proteína de nivelación (filamentos de actina) muscular línea Z, alfa 1 [<i>Ciona intestinalis</i>]	DNA helicasa, putativa	La helicasa es una enzima vital en los seres vivos ya que participa en los procesos de replicación, transcripción, recombinación y reparación del ADN, y de biogénesis de ribosomas. Son proteínas que se van desplazando longitudinalmente a lo largo de los enlaces fosfodiéster del ácido nucleico, separando las dos cadenas antiparalelas del ácido nucleico. usando para ello la energía que se desprende en la hidrólisis de ATP o GTP.

ANEXO E

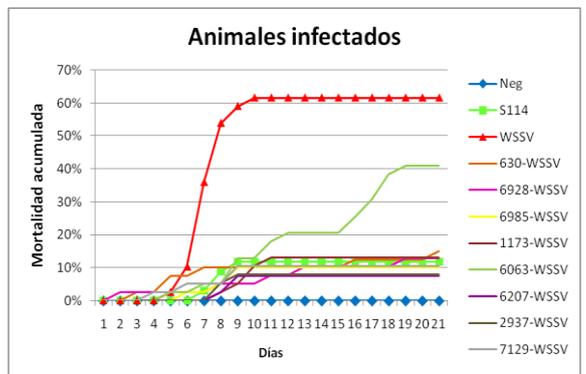
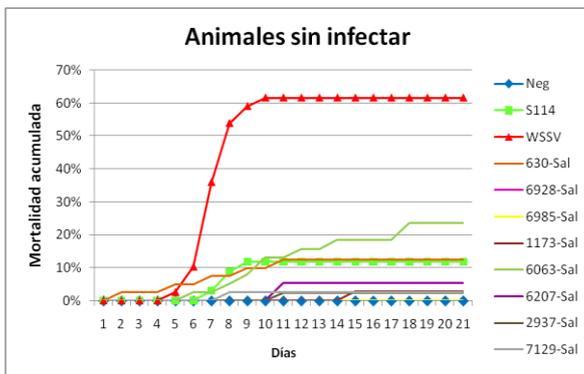
CURVAS DE MORTALIDAD ACUMULADA DE LOS 54 GENES

EVALUADOS POR DESAFIOS

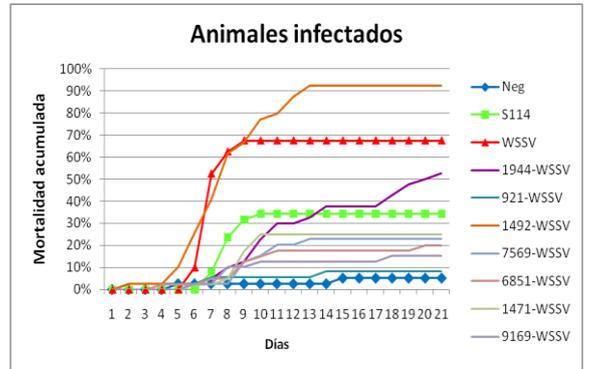
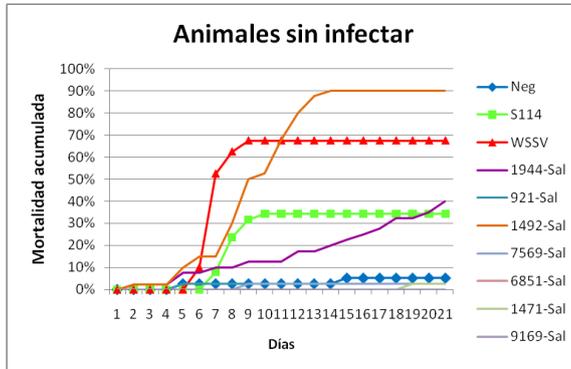
Desafío #1 (Julio de 2008)



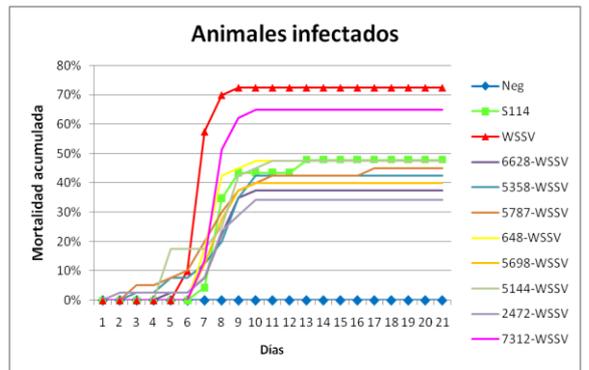
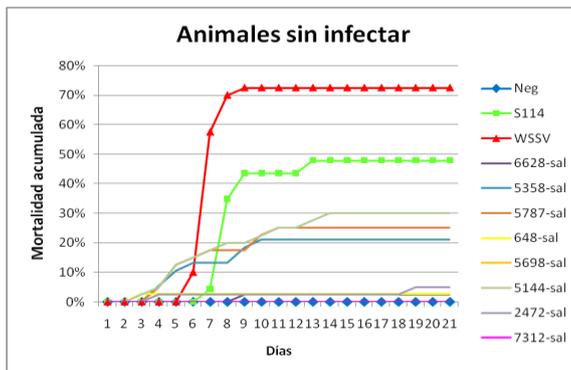
Desafío #2 (Agosto de 2008)



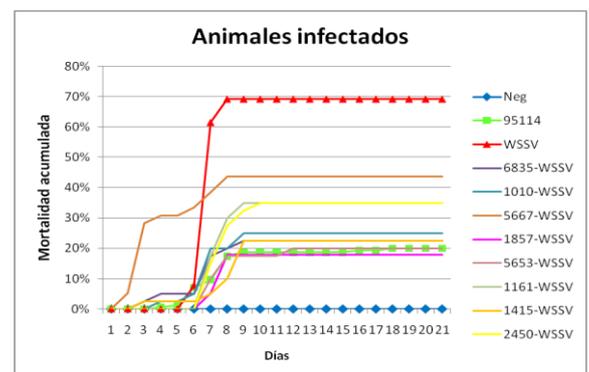
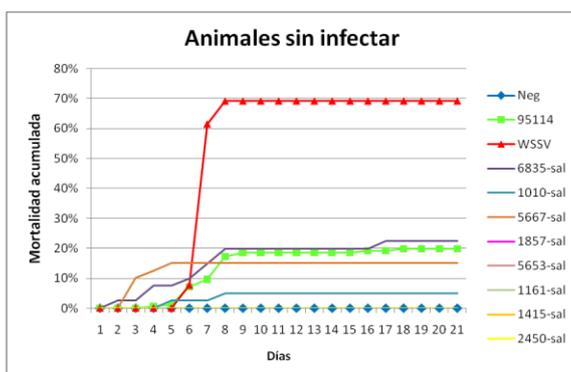
Desafío #3 (Septiembre de 2008)



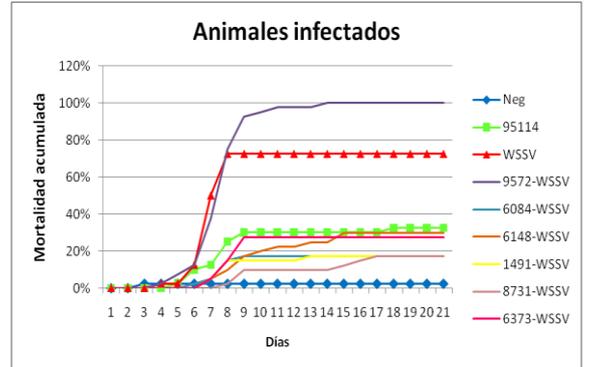
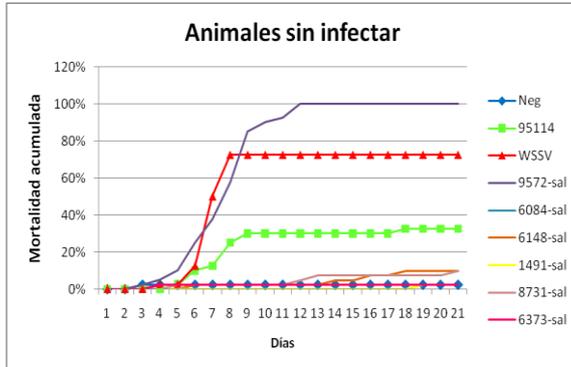
Desafío #4 (Octubre de 2008)



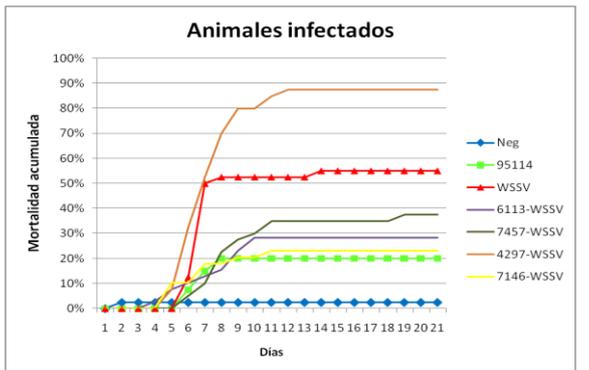
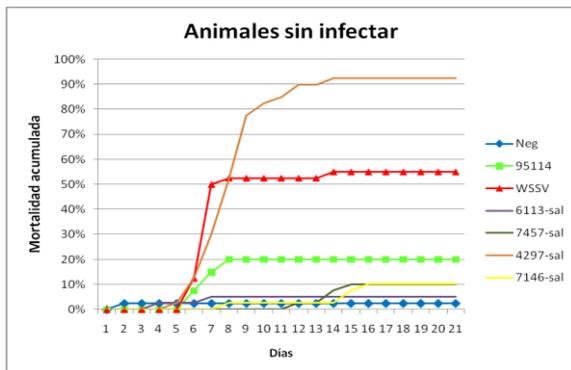
Desafío #5 (Octubre de 2008)



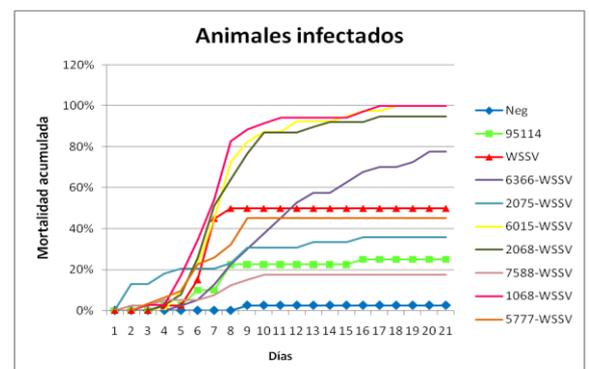
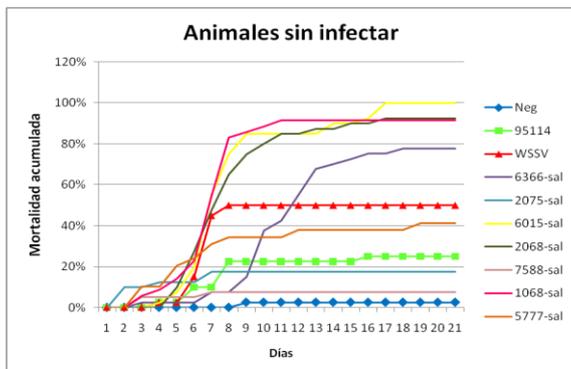
Desafío #6 (Noviembre de 2008)



Desafío #7 (Febrero de 2009)



Desafío #8 (Junio de 2009)



BIBLIOGRAFIA

1. Calderón, J., B. Bayot, I. Betancourt, and V. Alday de Graindorge. (1999). Monitoreo del virus de la mancha blanca en Ecuador. *El Mundo Acuicola* 5: 211-214.
2. Alday de Graindorge, V. y Griffith, D. 2000. Ecuador. In: Thematic review on Management Strategies for Major Diseases in Shrimp Aquaculture. A component of the WB/ NACA/WWF/FAO Program on Shrimp Farming and the Environment. Report of the workshop held in Cebu, Philippines from 28–30 November, 1999. pp. 17–19.
3. Sahul Hameed AS, Yoganandhan K, Satish S, Murugan V, Rasheed M, Kunthala Jayaraman (2001) Experimental pathogenicity of white spot syndrome virus (WSSV) in two freshwater crabs (*Partelphusa hydrodomus* and *P. pulvinata*). *Aquaculture* 201:179-186.

4. Robalino, J., Browdy, C.L., Prior, S., Metz, A., Parnell, P., Gross, P. and Warr, G. Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. *J. Virol.* 2004; 78:10442-10448.
5. Robalino, J., Bartlett, T., Shepard, E., Prior, S., Jaramillo, G., Scura, E., Chapman, R.W., Gross, P.S., Browdy, C.L., Warr, G.W. Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response? *J Virol* 2005; 79: 13561–13571.
6. Tirasophon, W., Roshorm, Y., Panyim, S. Silencing of yellow head virus replication in penaeid shrimp cells by dsRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 334:102-107.
7. Westenberg M., Heinhius B., Zuidema D., Vlak J.M., siRNA injection induces sequence-independent protection in *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus, *Virus Res.* 114 (2005) 133–139.
8. Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R. and Hannon, G. J. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 2001; 293:1146–1150.

9. McManus, M.T. and Sharp, P.A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nature reviews genetics* 2002; 3:737-747.
10. Randall G, Grakoui A, and Rice CM Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 235-240.
11. Berger, C. 2000. Aportes de la Bio-tecnología a la alimentación y a la inmunoestimulación de camarones peneidos. En: Cruz Suárez, L.E., D. Ricque-Marie, M. Tapia Salazar, M.A. Olvera-Novoa, y R. Civera-Cerecedo, (Eds.) *Avances en Nutrición Acuícola. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Merida, Yucatán.*
12. van de Braak, C.B.T, R. Faber, y J.H. Boon. Cellular and humoral characteristics of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1978) haemolymph. *Comparative Haematology International*, 2006; 6:4:194-203.
13. Destoumieux, D., P. Bulet, D. Loew, A. Van Dorsselaer, J. Rodríguez, and E. Bachere. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *The Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272(45): 28398-28406.

14. Söderhäll, K, Cerenius, L. and Johansson, M.W. The proPO-system and its role in cellular communication. In: Primordial Immunity; Foundations for the Vertebrate Immune System. Ann. New York Academy Sciences. 1994; 712:155-162
15. Robalino J, Ph.D., Antiviral immunity induced by double stranded RNA in a marine invertebrate. Medical University of South Carolina, 2006, 180 pags.
16. Robalino J, Almeida JS, McKillen D, Colglazier J, Trent HF 3rd, Chen YA, Peck ME, Browdy CL, Chapman RW, Warr GW, Gross PS. Insights into the immune transcriptome of the shrimp *Litopenaeus vannamei*: tissue-specific expression profiles and transcriptomic responses to immune challenge. *Physiol Genomics*. 2007 Mar 14;29(1):44-56.
17. UN-FAO , Departamento de Pesca y Acuicultura, Perfil Ecuador.
18. Flegel, T.W., S. Boonyaratpalin and B Withyachumnarnkul (1997). Progress in research on yellow-head virus and white spot virus in Thailand. In: T.W. Flegel and I.H. MacRae (Eds), *Diseases in Asian Aquaculture III*, Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila. Pp 285-295.

19. Lightner, D.V.; Redman, R.M. (1998): Strategies for the control of viral diseases of shrimp in the Americas. *Fish Pathology*, 33: 165-180.
20. Bonnichon V, Lightner DV, Bonami JR. (2006) Viral interference between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. 72(2):179-84.
21. Chang, P., C. Lo, Y. Wang and G. Kou. (1996). Identification of white spot syndrome associated baculovirus target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. *Dis Aquat Org*. Vol. 27:131-139.
22. Hossain, M.S.; Chakraborty, A.; Joseph, B.; Ota, S.K.; Karunasagar, I. 2001. Detection of new hosts for white spot syndrome virus of shrimp using nested polymerase chain reaction. *Aquaculture*, 198, 111.
23. Vidal, O.M., C.B. Granja, L.F. Aranguren, J.A. Brock and M. Salazar, 2001. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. *J. World Aquac. Soc.*, 32: 364-372.
24. Granja, C.B., L.F. Aranguren, O.M. Vidal, L. Aragón and M. Salazar, 2003. Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome

virus (WSSV) –infected *Litopenaeus vannamei*?. Dis. Aquat. Org., 54: 73-78.

25. Vlak JM, Bonami JR, Flegel TW, Kou GH, Lightner DV, Lo CF, Loh PC, Walker PW. (2006) Nimaviridae. En: Fauquet CM, MA Mayo, J Maniloff, U Desselberg and LA Ball (eds). Virus Taxonomy: VIII Report International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier Academic Press London. pp 187-192.

26. Chen LL, Wang HC, Huang CJ, Peng SE, Chen YG, Lin SJ, Chen WY, Dai CF, Yu HT, Wang CH, Lo CF, Kou GH. (2002) Transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of shrimp white spot syndrome virus. Virology. 301(1):136-47.

27. van Hulten MC, Witteveldt J, Peters S, Kloosterboer N, Tarchini R, Fiers M, Sandbrink H, Lankhorst RK, Vlak JM. (2001) The white spot syndrome virus DNA genome sequence. Virology. 286(1):7-22.

28. Yang F, He J, Lin X, Li Q, Pan D, Zhang X, Xu X. (2001) Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. J Virol. 75(23):11811-20.

29. Li DF, Zhang MC, Yang HJ, Zhu YB, Xu X. Beta-integrin mediates WSSV infection. *Virology*. 2007 Nov 10;368(1):122-32.
30. Tsai JM, Wang HC, Leu JH, Wang AH, Zhuang Y, Walker PJ, Kou GH, Lo CF. (2006) Identification of the nucleocapsid, tegument, and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. *J Virol*. 80(6):3021-3029.
31. Tsai MF, Lo CF, van Hulten MC, Tzeng HF, Chou CM, Huang CJ, Wang CH, Lin JY, Vlak JM, Kou GH. (2000a). Transcriptional analysis of the ribonucleotide reductase genes of shrimp white spot syndrome virus. *Virology*. 277(1):92-9.
32. van Hulten MC, Tsai MF, Schipper CA, Lo CF, Kou GH, Vlak JM. (2000) Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions. *J Gen Virol. (Pt 2)*:307-316
33. Van Hulten MC, Vlak JM. (2001). Identification and phylogeny of a protein kinase gene of white spot syndrome virus. *Virus Genes*. 22(2):201-207.

34. Yang F, He J, Lin X, Li Q, Pan D, Zhang X, Xu X. (2001). Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *J Virol.* 75(23):11811-20.
35. Tsai MF, Yu HT, Tzeng HF, Leu JH, Chou CM, Huang CJ, Wang CH, Lin JY, Kou GH, Lo CF. (2000). Identification and characterization of a shrimp white spot syndrome virus (WSSV) gene that encodes a novel chimeric polypeptide of cellular-type thymidine kinase and thymidylate kinase. *Virology.* 277(1):100-110.
36. Li Z, Lin Q, Chen J, Wu JL, Lim TK, Loh SS, Tang X, Hew CL. (2007) Shotgun identification of the structural proteome of shrimp white spot syndrome virus and iTRAQ differentiation of envelope and nucleocapsid subproteomes. *Mol Cell Proteomics.* 6(9):1609-20.
37. Huang C, Zhang X, Lin Q, Xu X, Hew CL. (2002). Characterization of a novel envelope protein (VP281) of shrimp white spot syndrome virus by mass spectrometry. *J Gen Virol. (Pt 10):*2385-92.
38. Cai S., Huang J., Wang C., Song X., Sun X., Yu J., Zhang Y., Yang C. (1995). Epidemiological studies on the explosive epidermic disease of prawn in 1993-1994. *J Fish China* 19: 112-117.

39. Chang PS, Chen HC, Wand YC (1998) Detection of white spot syndrome associated baculovirus WSBV in experimentally infected wild shrimps, crabs and lobsters by in situ hybridation. *Aquaculture* 164:23-242.
40. Wang YC, Lo CH, Chang PS, Kou GH (1998) Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. *Aquaculture* 164:221-231.
41. Wongteerasupaya C, Vickers JE, Sriurairatana S, Nash GL and 6 others (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* 21:77-96.
42. Lo CF, Leu JH, Ho CH, Chen CH and 6 others (1996). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome virus (WSSV) in penaeid shrimp using polymerase chain reaction. *Dis Aquat Org* 25:133-141.
43. Flegel TW (1997) Special tropic review: major viral disease of the black tiger prawn *Penaeus monodon* in Thailand. *World J Microbiol Biotechnol* 13:433-442-

44. Lightner DV, Redman DRM, Poulos BT, Nunan LM, Mari JL, Hasson KW, Bonami JR (1997). Taura syndrome etiology, pathology, hosts and geographic distribution, and detection methods. In: New approaches to viral diseases of aquatic animals. National Research Institute of Aquaculture, Nansai Mie, Japan, p 190-205.

45. Nunan LM, Poulos BT, Lightner DV (1998) The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp aquaculture 160: 19-30.

46. Sahul Hameed AS, Anil Kumar M, Stephen Raj ML, Kunthala J (1998) Studies on the pathogenicity of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus and its detection in shrimp by immunological methods. Aquaculture 160:31-45.

47. Peng SE, Lo CF, Ho CH, Chang CF, Kou GH (1998) Detection of white spot baculovirus (WSBV) in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, using polymerase chain reaction. Aquaculture 164:253-262

48. Sahul Hameed AS, Xavier Charles M, Anilkumar M (2000) Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus. *Aquaculture* 183:207-213.
49. Huang C, Zhang L, Zhang J, Xiao L, Wu Q, Chen D, Li JKK (2001) Purification and characterization of white spot syndrome virus (WSSV) produced in an alternative host: cray fish *Cambarus clarkii*. *Virus Res* 76:115-125.
50. Jiravanichpaisal P, Bangyeekhun E, Soderhall K, Soderhall I (2001) Experimental infection of white spot syndrome in fresh water cray fish *Pacifastacus leniusculus*. *Dis Aquat Org* 47:151-157.
51. Kanchanaphum P, Wongteerasupaya C, Sitdilokratana N, Boonsaeng V, Panyim S, Tassanakajon A, Withyachumnarnkul B, Flegel TW, (1998) Experimental transmission of white spot syndrome virus WSSV from crabs to shrimp *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org* 34:1-7.
52. Chen LL, Lo CF, Chiu YL, Chang CF, Kou GH (2000) Natural and experimental infection of white spot syndrome virus WSSV in benthic larvae of mud crab *Scylla serrata*. *Dis Aquat Org* 40:157-161.

53. Corbel V, Zuprizal Z, Shi C, Huang I, Sumartono, Arcier JM, Bonami JR (2001) Experimental infection of European crustaceans with white spot syndrome virus (WSSV). *J Fish Dis* 24:377-382.
54. Sahul Hameed AS, Murthi BLM, Raseed M, Satish S, Yoganandhan K, Murugan V, Kunthala Jarayaman (2002). An investigation of *Artemia* as a possible vector for white spot syndrome virus (WSSV) transmission to *Penaeus indicus*. *Aquaculture* 204:1-10.
55. Soto MA, Lotz JM.(2001) Epidemiological parameters of White Spot Syndrome Virus infections in *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus*. *J Invertebr Pathol.* 78(1):9-15.
56. Wu JL, Namikoshi A, Nishizawa T, Mushiak K, Teruya K, Muroga K.(2001) Effects of shrimp density on transmission of penaeid acute viremia in *Penaeus japonicus* by cannibalism and the waterborne route. *Dis Aquat Organ* 47(2):129-35.
57. Lo, C. F., C. H. Ho, C. H. Chert, K. F. Liu, Y. L. Chiu, P. Y. Yeh, S. E. Peng, H. C. Hsu, H. C. Liu, C. F. Chang, M. S. Su, C. H. Wang & G. H. Kou. (1997). Detection and tissue tropism of white spot syndrome

baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis in reproductive organs. *Dis. Aquat. Org.* 30:53-72.

58. Alday de Graindorge, V. and Flegel, T.W., (1999). Diagnosis of shrimp diseases with emphasis on the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Multimedia Asia Co. Ltd. Bangkok 10400, Thailand.

59. Lo.C.F Ho CH. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimps, crabs and other arthropods. *Dis Aquat Org*, 1996b.

60. Tapay, L.M., Y. Lu, R.B. Gose, J.A. Brock, and P.C. Loh. 1996. Infection of white-spot baculovirus-like virus (WSBV) in two species of penaeid shrimp *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *P. vannamei* (Boone). In *Diseases in Asian Aquaculture III, Proceedings of the third symposium on diseases in Asian aquaculture*. 29 January to 2 February 1996. Bangkok, Thailand.

61. Lightner D.V. (1996) *A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

62. Briggs, M.; Funge-Smith, S.; Subasinghe, R.P.; Phillips, M. 2005. Introducciones y movimiento de dos especies de camarones peneidos en Asia y el Pacífico. FAO Documento Técnico de Pesca. No. 476. Roma. 86p.
63. Lightner, D.V. (2002). Shrimp diseases and exotic pathogens. Proceedings of the Shrimp Virus Disease Workshop, Nov 28–29, 2001, New Orleans, LA: National Marine Fisheries Service, Panama City Laboratory Contribution 02–05, Panama City, FL, 6–10.
64. Jacobs, B. L., and J. O. Langland. When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to doublestranded RNA. *Virology* 219:339–349 (1996).
65. Kumar, M., and G. G. Carmichael. 1998. Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1415–1434.
66. Weber F, Wagner V, Rasmussen SB, Hartmann R, Paludan SR. Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *J Virol.* 2006 May;80(10):5059-64.

67. Lee, J. Y., J. A. Marshall, and D. S. Bowden. 1994. Characterization of rubella virus replication complexes using antibodies to double-stranded RNA. *Virology* 200:307–312.
68. Bagasra O., Prilliman K.R. RNA interference: the molecular immune system, *J. Mol. Histol.* 35 (2004) 545–553.
69. Janeway, C.A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 54: 1–13.
70. Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124:783-801.
71. Petrelli V, Dostert C, Muruve DA, Tschopp J. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:615-622.
72. Kawai T. & Akira S., 2007. Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *J Biochem.* 2007; 141:137-145.

73. Kato, H., Takeuchi O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K.J., *et al.* Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006; 441:101-105.

74. Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E. *et al.* Length dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation associated gene 5. *J. Exp. Med.* 2008; 205:1601-1610.

75. Koyama, S., Ishii, K.J., Kumar, H., Tanimoto, T., Coban, C., Uematsu, S., Kawai, T. and Akira, S. Differential role of TLR- and RLR-signaling in the immune responses to influenza A virus infection and vaccination. *J. Immunol.* 2007; 179:4711-4720.

76. Kumar, H., Kawai, T., Kato, H., Sato, S., Takahashi, K., Coban, C., Yamamoto, M., Uematsu, S., Ishii, K.J., Takeuchi, O., and Akira, S. Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses. *J. Exp. Med.* 2006; 203: 1795-1803.

77. Samanta, M., Iwakiri, D., Kanda, T., Imaizumi, T., Takada, K. EB virus-encoded RNAs are recognized by RIG-I and activate signaling to induce type I IFN. *EMBO J* 2006; 25:4207-4214.
78. Samanta, M., Iwakiri, D., Takada, K., Epstein-Barr virus-encoded small RNA induces IL-10 through RIG-I-mediated IRF-3 signaling. *Oncogene* 2008; 27: 4150-4160.
79. Madigan M., Martinko, Parker. *Brock Biology of Microorganisms*. Ninth Edition. 2000. Prentice Hall. Pág. 762-764.
80. Levy, D. E., and A. Garcia-Sastre The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion Volume 12, Issue 2, Pages 143-156 (2001).
81. Hirai, M., Terenius, O., Lit, W. and Faye, I. Baculovirus and dsRNA induce Hemolin, but no antibacterial activity, in *Antheraea pernyi*. *Insect Molecular Biology* 2004; 13:399–405.
82. Faye, I., Pye, A., Rasmuson, T., Boman, H.G. and Boman, I.A. Insect immunity II. Simultaneous induction of antibacterial activity and selective synthesis of some hemolymph proteins in diapausing pupae

of *Hyalophora cecropia* and *Samia cynthia*. *Infect Immun* 1975; 12: 1426–1438.

83. Rasmuson, T. and Boman, H.G. Insect immunity – V. Purification and some properties of immune protein P4 from haemolymph of *Hyalophora cecropia* pupae. *Insect Biochem* 1979; 17: 133–140.

84. Lanz-Mendoza, H., Bettencourt, R., Fabbri, M. and Faye, I. Regulation of the insect immune response: The effect of hemolin on cellular immune mechanisms. *Cell Immun* 1996; 169: 47–54.

85. Pitaluga, A.N., Mason, P.W., Traub-Cseko, Y.M. Non-specific antiviral response detected in RNA-treated cultured cells of the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Developmental and Comparative Immunology* 2008; 32: 191–197.

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

87. Covey, S.N., Al-Kaff, N.S., Langara A, Turner D.S. Plants combat infection by gene silencing. *Nature* 1997; 385:781-782.

88. Ratcliff, F., Harrison, B. and Baulcombe, D. Asimilarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 1997; 276: 1558-1560.
89. Carrington, J. C., and Ambros, V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 2003; 301:336–338.
90. Chen, C.Z., Li, L., Lodish, H.F., and Bartel, D.P. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004; 303:83–86.
91. Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D. L., Fire, A., Ruvkun, G., and Mello, C. C. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 2001; 106:23–34.
92. Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., and Hannon, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001; 409:363–366.
93. Hutvagner, G. & Simard, M. J. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2008; 9: 22–32.

94. Meister, G. & Tuschl, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 2004; 431: 343–349.
95. Geley, S., Müller, C. RNAi: ancient mechanism with a promising future, *Exp. Gerontol.* 2004; 39: 985–998.
96. Su, J., Oanh, D.T.H., Lyons, R. E., Leeton, L., van Hulten, M.C.W., Tan, S., Song, L., Rajendran, K.V., Walker, P.J. A key gene of the RNA interference pathway in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*: Identification and functional characterisation of Dicer-1. *Fish & Shellfish Immunology.* 2008; 24: 223-233.
97. Dechklar, M., Udomkit, A., Panyim, S. Characterization of Argonaute cDNA from *Penaeus monodon* and implication of its role in RNA interference. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008; 367: 768–774.
98. Keene, KM., Foy, BD., Sanchez-Vargas, I., Beaty, BJ., Blair, CD., Olson, KE. RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (Alphavirus; Togaviridae) infection of *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:17240–17245.

99. Goto, A., Blandin, S., Royet, J., Reichhart, JM., Levashina, EA. Silencing of Toll pathway components by direct injection of double-stranded RNA into *Drosophila melanogaster* adult flies. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:6619–6623.
100. Gross PS, Bartlett TC, Browdy CL, Chapman RW, Warr GW. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. *Dev Comp Immunol*. 2001 Sep;25(7):565-77.
101. Huang, X. and Madan, A. (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res*. 9: 868-877. <http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>
102. <http://www.expasy.ch/tools/dna.html>
103. Snutch TP, Heschl MF, Baillie DL. The *Caenorhabditis elegans* hsp70 gene family: a molecular genetic characterization. *Gene*. Volume 64. Págs. 241-55 (1988)
104. Feder, M.E. and Hofmann, G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 243–282 (1999).

105. Parsell, D.A. and Lindquist, S. (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27, 437–496.
106. Zugel, U. and Kaufmann, S.H. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 19–39 (1999).
107. Jayakumar, J., Suzuki, K., Sammut, I.A., Smolenski, R.T., Khan, M., Latif, N., Abunasra, H., Murtuza, B., Amrani, M. and Yacoub, M.H. Heat shock protein 70 gene transfection protects mitochondrial and ventricular function against ischemia reperfusion injury. *Circulation* 104, I303–I307 (2001).
108. Southan C. A genomic perspective on human proteases as drug targets. *Drug Discov Today* 2001.
109. Wolf M, Clark-Lewis I, Buri C, Langen H, Lis M, Mazzucchelli L. "Cathepsin D specifically cleaves the chemokines macrophage inflammatory protein-1 alpha, macrophage inflammatory protein-1 beta, and SLC that are expressed in human breast cancer". *Am. J. Pathol.* 162 (4): 1183–90 (April 2003).

110. Barrett A.J., Rawlings ND, Woessner JF. The Handbook of Proteolytic Enzymes, 2nd ed. Academic Press, 2003.
111. Hall A., Karplus Andrew P. and Poole L. B. Typical 2-Cys Peroxiredoxins: Structures, mechanisms and functions. FEBS J. 2009 May ; 276(9): 2469–2477.
112. Kumar SR, Ahamed VPI, Sarathi M, Basha AN, Hameed ASS. Immunological responses of *Penaeus monodon* to DNA vaccine and its efficacy to protect shrimp against white spot syndrome virus (WSSV). Fish Shellfish Immunol 2008; 24:467–78.
113. Cyr, D.M., Lu, X. and Douglas, M.G. Regulation of Hsp70 function by a eukaryotic DnaJ homolog. J. Biol. Chem. 267, 20927–20931 (1992).
114. Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. Cell. 2006 Jun 16; 125 (6) :1111-24.
115. Kedde M, Strasser MJ, Boldajipour B, Oude Vrielink JA, Slanchev K, Sage C, Nagel R, Voorhoeve P. M., van Duijse J, Ørom U. A, Lund A.

H., Perrakis A., Raz E., Agami R. RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell* 131:1273–86 (2007).