

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA

**ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO Y MOLECULAR EN CAMARÓN BLANCO  
(*Litopenaeus vannamei*), INFECTADO CON EL VIRUS DE LA MANCHA BLANCA  
Y SOMETIDO A BIOENSAYOS DE SILENCIAMIENTO GÉNICO CON dsRNA.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

**AYIN QUETZALCOATL ALVARADO ARELLANO**

Tutores:

Dr. Claudio Humberto Mejía Ruíz

MVZ M. en C. Gisela Martínez Romero

México, Distrito Federal

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*There are places i remember  
All my life though some have changed  
Some forever not for better  
Some have gone and some remain  
All these places have their moments  
With lovers and friends i still can recall  
Some are dead and some are living  
In my life i've loved them all.*

*(Lennon & McCartney)*

## DEDICATORIA

A mamá y papá. Gracias por darme la vida y llevarme hasta donde estoy. Gracias por no cortarme las alas y dejarme ser. Gracias por enseñarme que lo más importante es no olvidar quien eres y hacia dónde vas. Gracias por dejarme seguir mis sueños y tratar de alcanzar lo inalcanzable. Gracias por levantarme cuando me sentía derrotado. Simplemente muchas gracias por ser mis padres. Sin ustedes yo no sería nadie.

A Ixchel. Gracias por siempre estar ahí. Los sueños se pueden alcanzar con bastante perseverancia, esfuerzo y dedicación. ¿No crees qué es tu turno? Siempre voy a estar a tu lado para apoyarte. Te quiero mucho.

A Mariana. Tú fuiste un gran pilar para mí durante este proyecto. Quiero decirte las palabras más hermosas y hacerte saber lo mucho que tu amor, cariño, apoyo, confianza y compañía significan para mí. Gracias por hacer mis días muy felices. TA&

A Raúl, Cristina y Yanina. No tengo palabras para agradecerles lo mucho que hicieron por todo su apoyo incondicional. Claro que tampoco quiero excluir al “nopal”, “saidch”, “stitcha” y al pobre “ecoloco” que la lechuga se llevo. Gracias por hacerme sentir en casa cuando más lejos de esta me encontraba.

A todos mis tíos, primos y abuelas. Gracias familia.

A Vladimir, Pablo, Carlos G., Enrique. Gracias por los buenos ratos amigos. Sigam sus sueños.

A Sara y Amaury. Muchas gracias por enseñarme que la perseverancia y el trabajo duro siempre van a rendir frutos. Nunca se den por vencidos. Los quiero mucho.

A Jonas un buen amigo.

A Silvia Ibáñez. Tú mejor que nadie conoce mi evolución y maduración durante mi formación académica. Muchas gracias por tus buenos consejos.

## AGRADECIMIENTOS

A mi *alma mater* la UNAM-FMVZ por darme todas las herramientas y medios necesarios para desarrollarme académicamente.

Al H. Consejo Técnico de la FMVZ por brindarme las facilidades para realizar este proyecto.

A Gisela. Gracias por todo tu apoyo, amistad, confianza, tiempo y sobre todo por aventurarte conmigo a realizar este trabajo.

A la Dra. Laura Romero. Gracias por todo su apoyo y por creer en mí.

Al Dr. Humberto. Gracias por todo su apoyo, por darme las facilidades y medios para poder realizar este trabajo. También muchas gracias a su familia.

Al CIBNOR la Paz, BCS y al CIAD Mazatlán por su apoyo, material y equipo que utilicé para la elaboración de mi tesis.

Al Biol. Mar. Hever Lastinere Barragan. Muchas gracias por su asesoría y orientación técnica en el laboratorio, durante mi estancia en el CIBNOR.

Al Comité de Estatal de Sanidad Acuícola de Baja California Sur. Por las facilidades brindadas para poder realizar el traslado de mis camarones.

Al M en C Leobardo Montoya. Gracias por su orientación, tiempo y asesoría técnica en la elaboración del bioensayo.

Al BP Luís Adrian Gámez Alejo, a la IBQ Carolina Ceballos Bernal y al IB Victor Joaquín Álvarez López. Muchas gracias por su apoyo técnico y orientación durante la realización del bioensayo en las instalaciones del CIAD. También les agradezco su amistad y buen trato.

A Martha Palomec, Martha Daniela (“las marthas”) y Marce Ruíz, muchas gracias por su amistad y por ayudarme durante mi estancia en Mazatlán.

Al Sr. Luis Antonio Morales A., Alma García Jiménez, Dani y Felipe (“los chiminos”). Agradezco los cortes histológicos que realizaron para mi tesis.

Al Sr. Jaime Eugenio Córdova. Por arreglar las fotos de este trabajo y las de las múltiples presentaciones.

A los Drs. Gerardo Salas, Elizabeth Morales Salinas, Adriana Méndez y Bety Vanda. Muchas gracias por sus enseñanzas y experiencias brindadas.

Al MVZ M en C Saúl Paz. Muchas gracias por sus conocimientos brindados en la parte de la estadística. De verdad estoy en deuda contigo “pex”.

A “Javis”, “Puchy”, “Juanote”, “Quique”, “las contubernias”, “Coralia”, Mónica Yunuen, “la poblana”, Abel, Noé, “Nataly”, “Misaquito”. Muchas gracias por su apoyo y compañerismo.

A “las weras” Luza y Vanessa. Gracias por estar amigas.

A Claudia, Beto, Rocío, Paola, Hector, Mary. Gracias por compartir tan buenas experiencias y momentos tan agradables. ¿Qué rápido pasa el tiempo, no? La mejor de las vibras.

A todos los animales que durante mi formación dieron su vida.

# CONTENIDO

	Páginas
<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
2.1 ANTECEDENTES	3
2.2 AGENTE ETIOLÓGICO	4
2.2.1 MORFOLOGÍA DEL WSSV	4
2.2.2 MORFOLOGÍA DE LOS VIRIONES DEL WSSV	5
2.2.3 CICLO VIRAL DEL WSSV	5
2.2.4 GENOMA	7
1. GENES ESTRUCTURALES	7
2. GENES FUNCIONALES O FISIOLÓGICOS	8
3. GENES DE LATENCIA	8
4. GENES DE REGULACIÓN TEMPORAL	9
2.2.5 HOSPEDEROS	11
2.2.6 VIAS DE TRANSMISIÓN	11
2.2.7 LESIONES MACRO Y MICROSCÓPICAS	11
2.3 MECANISMOS INMUNOLÓGICOS EN CAMARONES CONTRA AGENTES INFECCIOSOS.	13
2.3.1 SILENCIAMIENTO GÉNICO O INTERFERENCIA POR RNA (RNAi)	15
2.4 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	19
2.5 ESTRATEGIAS PÁRA EL CONTROL DEL WSSV	20
2.6 INACTIVACIÓN DEL WSSV	21
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>22</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>22</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>23</b>
6.1 CAMARONES	23
6.2 VIRUS (WSSV)	23
6.3 TITULACIÓN VIRAL Y DOSIS DE RETO	24
6.4 DISEÑO EXPERIMENTAL Y CONDICIONES	24
6.5 SÍNTESIS DE LA DOBLE CADENA (dsRNA)	25

6.5.1 DOSIS DE dsRNA	26
6.6 EFICACIA DE LA INTERFERENCIA POR dsRNA Y EVALUACIÓN DE LA INFECCIÓN POR WSSV	27
6.6 HISTOPATOLOGÍA	27
6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	29
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>30</b>
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>44</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>48</b>
<b>10. APENDICE</b>	<b>50</b>
<b>11. REFERENCIAS</b>	<b>53</b>

## FIGURAS

## Páginas

<b>Figura 1a.</b> Morfología del WSSV (microscopía electrónica contraste negativo)	<b>4</b>
<b>Figura 1b.</b> Morfología del WSSV (microscopía electrónica contraste negativo.	<b>4</b>
<b>Figura 1c.</b> Diagrama de las proteínas estructurales del WSSV	<b>4</b>
<b>Figura 2a.</b> Partículas virales del WSSV (microscopía electrónica de transmisión)	<b>5</b>
<b>Figura 2b.</b> Partículas virales del WSSV (microscopía electrónica de transmisión)	<b>5</b>
<b>Figura 3.</b> Esquema de la morfogénesis y ciclo viral del WSSV	<b>6</b>
<b>Figura 4.</b> Esquema del mecanismo de RNAi	<b>18</b>
<b>Figura 5.</b> Mortalidad acumulada	<b>30</b>
<b>Figura 6a.</b> PCR $\beta$ -actina Grupo A (controles negativos)	<b>32</b>
<b>Figura 6b.</b> PCR $\beta$ -actina Grupo B (tratados dsRNA-vp28)	<b>32</b>
<b>Figura 6c.</b> PCR $\beta$ -actina Grupo C (tratados dsRNA-orf89)	<b>32</b>
<b>Figura 6d.</b> PCR $\beta$ -actina Grupo D (controles positivos)	<b>32</b>
<b>Figura 7a.</b> PCR vp28 Grupo A (controles negativos)	<b>33</b>
<b>Figura 7b.</b> PCR vp28 Grupo B (tratados dsRNA-vp28)	<b>33</b>
<b>Figura 7c.</b> PCR vp28 Grupo C (tratados dsRNA-orf89)	<b>33</b>
<b>Figura 7d.</b> PCR vp28 Grupo D (controles positivos)	<b>33</b>
<b>Figura 8a.</b> PCR ORF89 Grupo A (controles negativos)	<b>34</b>
<b>Figura 8b.</b> PCR ORF89 Grupo B (tratados dsRNA-vp28)	<b>34</b>
<b>Figura 8c.</b> PCR ORF89 Grupo C (tratados dsRNA-orf89)	<b>34</b>
<b>Figura 8d.</b> PCR ORF89 Grupo D (controles negativos)	<b>34</b>
<b>Figura 9a.</b> Branquias de camarones tratados con dsRNA-vp28. HE 40X	<b>41</b>
<b>Figura 9b.</b> Branquias de camarones no tratados con dsRNA. HE 40X	<b>41</b>
<b>Figura 10a.</b> Órgano linfoide de camarones tratados con dsRNA-orf89. HE 40X	<b>41</b>
<b>Figura 10b.</b> Órgano linfoide de camarones no tratados con dsRNA. HE 40X	<b>41</b>

## FIGURAS

	Páginas
<b>Figura 11a.</b> Órgano linfoide de camarones controles negativos. HE 100X	42
<b>Figura 11b.</b> Órgano linfoide de camarones tratados con dsRNA-orf89. HE 100X	42
<b>Figura 11c.</b> Órgano linfoide de camarones controles positivos. HE 100X	42
<b>Figura 12a.</b> Branquias de camarones controles negativos. HE 100X	42
<b>Figura 12b.</b> Branquias de camarones tratados con dsRNA-vp28. HE 100X	42
<b>Figura 12c.</b> Branquias de camarones controles positivos. HE 100X	42
<b>Figura 13a.</b> Estómago de camarones controles negativos. HE 100X	43
<b>Figura 13b.</b> Estómago de camarones tratados con dsRNA-orf89. HE 100X	43
<b>Figura 13c.</b> Estómago de camarones controles positivos. HE 100X	43
<b>Figura 14a.</b> Corazón de camarones controles negativos. HE 40X	43
<b>Figura 14b.</b> Corazón de camarones tratados con dsRNA-vp28. HE 40X	43

## CUADROS

	Páginas
<b>Cuadro 1.</b> Función de los genes del WSSV	10
<b>Cuadro 2.</b> Esquema del diseño experimental	25
<b>Cuadro 3.</b> Iniciadores utilizados para realizar las amplificaciones (PCR)	26
<b>Cuadro 4.</b> Diseño experimental y grados de lesión (estadística)	36
<b>Cuadro 5.</b> Lesiones observadas en el Grupo A (controles negativos)	37
<b>Cuadro 6.</b> Lesiones observadas en el Grupo B (Tratados con dsRNA-vp28)	38
<b>Cuadro 7.</b> Lesiones observadas en el Grupo C (Tratados con dsRNA-orf89)	39
<b>Cuadro 8.</b> Lesiones observadas en el Grupo D (controles negativos)	40

## 1. Resumen

ALVARADO ARELLANO AYIN QUETZALCOATL. Estudio histopatológico y molecular en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), infectado con el virus de la mancha blanca y sometido a bioensayos de silenciamiento génico con dsRNA. México, Distrito Federal. (Bajo la dirección del Dr. Claudio Humberto Mejía Ruíz y la MVZ M. en C. Gisela Martínez Romero).

La producción de camarones es seriamente amenazada por las enfermedades virales, dentro de éstas un patógeno importante es el síndrome del virus de la mancha blanca o White Spot Syndrome Virus (WSSV); el cual es el único miembro del género *Whispovirus* de la familia *Nimaviridae*. Dentro del genoma del WSSV se han descrito diversos genes, uno de los más importantes el vp28, el cual está involucrado en la formación de la envoltura y forma parte primordial de la adhesión del virus hacia las células blanco del camarón. También se han descrito otros genes como el orf89, el cual es considerado como un gen de latencia. Las lesiones macroscópicas que ocasiona el WSSV son manchas blancas en el exoesqueleto (no siempre observadas) y a nivel histológico se observa hipertrofia nuclear, cuerpos de inclusión intranucleares anfófilos amorfos y necrosis en estómago, branquias y órgano linfoide. Uno de los diversos mecanismos inmunológicos que se han descrito en camarones contra enfermedades virales es el RNAi o silenciamiento génico post-transcripcional. El mecanismo de RNAi se realiza mediante la introducción de una cadena doble de RNA (dsRNA) a las células blanco de los camarones, con la ayuda de diversos complejos enzimáticos (Enzimas “Dicer” y el complejo RISC) tiene como objetivo final lograr la degradación del RNA mensajero (RNAm) viral 100% complementario y de este modo inhibir así la síntesis de proteínas.

En el presente estudio se describen las diferencias en las lesiones provocadas por el WSSV en camarones infectados con el WSSV y sometidos (con dsRNA-vp28 y con dsRNA-orf89) y no sometidos a bioensayos de silenciamiento génico por dsRNA específico del WSSV. Donde se observó que los camarones sometidos a silenciamiento génico (con dsRNA-vp28 y dsRNA-orf89) no presentaron las lesiones características de la enfermedad mientras que los camarones que no fueron sometidos a silenciamiento génico exhibieron las lesiones asociadas a la infección por WSSV.

# 1. INTRODUCCIÓN.

## 2.1 ANTECEDENTES.

La producción de camarón es una de las mayores industrias en el mundo de la acuicultura, la cual ha tenido un rápido crecimiento en los últimos años <sup>(1,2)</sup>. A partir de 1990 se ha convertido en un gran negocio y en 2002 llegó a tener una producción mundial de más de 1 millón de toneladas métricas <sup>(3)</sup>. Sin embargo, el cultivo de camarón es seriamente afectado por diferentes agentes patógenos, los cuales ocasionan problemas económicos en diversas partes del mundo <sup>(3,4)</sup>.

Dentro de los agentes infecciosos, los virus son los más importantes. Existen alrededor de veinte virus reconocidos que afectan a camarones peneidos, pero únicamente cuatro de ellos tienen importancia económica para la industria acuícola <sup>(2, 5)</sup>. Estos son: Virus de la Cabeza Amarilla (YHV), Síndrome del Virus de la Mancha Blanca (WSSV), Virus de la Necrosis Infecciosa Hematopoyética e Hipodérmica (IHHNV) y Virus del Síndrome de Taura (TSV) <sup>(2, 5, 6, 7, 8, 9,10)</sup>.

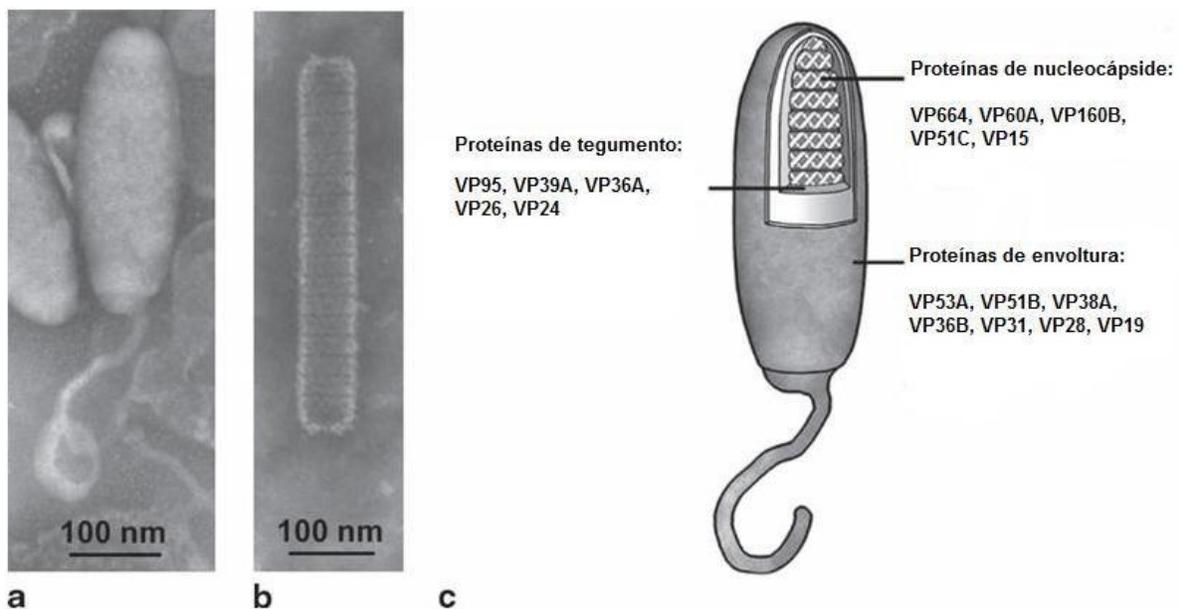
De los más dañinos se considera al WSSV, detectado por primera vez entre 1992 y 1993 en las costas de China y en algunos condados del norte de Taiwan, donde se diseminó rápidamente la enfermedad a otras áreas del sureste Asiático <sup>(2, 4,11)</sup>. Su primera aparición en el continente americano fue en 1999, donde ocasionó efectos desastrosos en granjas camaronícolas de *Litopenaeus vannamei* y *Litopenaeus stylirostris* <sup>(2, 4, 5, 6, 8)</sup>; fue también en ese año que se presentaron los primeros casos en costas mexicanas del Golfo de México <sup>(12, 13)</sup>.

## 2.2 AGENTE ETIOLÓGICO.

El WSSV recibió su nombre por las lesiones que produce; sin embargo, éstas no siempre se manifiestan. Basado en sus características morfológicas y genéticas, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) ha asignado al WSSV como miembro único del género *Whispovirus*, en una nueva familia llamada *Nimaviridae* <sup>(14, 11)</sup>. Este término hace alusión a la extensión de aspecto filiforme en su porción final (*nima* en latín que significa “hilo”) <sup>(11)</sup>.

### 2.2.1 MORFOLOGÍA DEL WSSV.

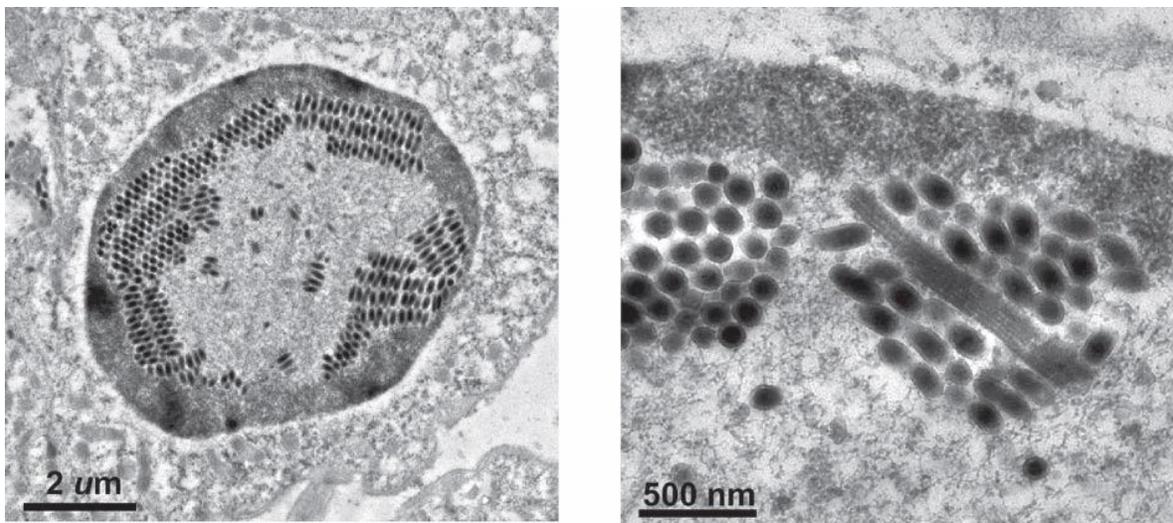
El virus mide 80-120 nm de ancho x 250-380 nm de longitud <sup>(8, 11)</sup> y presenta un apéndice filamentososo estrecho en su extremo final, que semeja una cola. La nucleocápside (Fig. 1a, b y c) tiene forma de vara y mide aproximadamente 330-350 nm de longitud x 58-57 nm de ancho <sup>(2, 3, 4, 11)</sup>.



**Fig. 1** a-c Morfología del virión de WSSV. Microscopía electrónica de contraste negativo de (1a) un virión intacto de WSSV que muestra la extensión semejante a una “cola” y (1b) la nucleocápside. (1c) Diagrama en el cual se pueden observar las proteínas estructurales de las capas de un virión de WSSV, por ejemplo, proteínas de envoltura, tegumento y nucleocápside <sup>(11)</sup>.

### 2.2.2 MORFOLOGÍA DE LOS VIRIONES DEL WSSV.

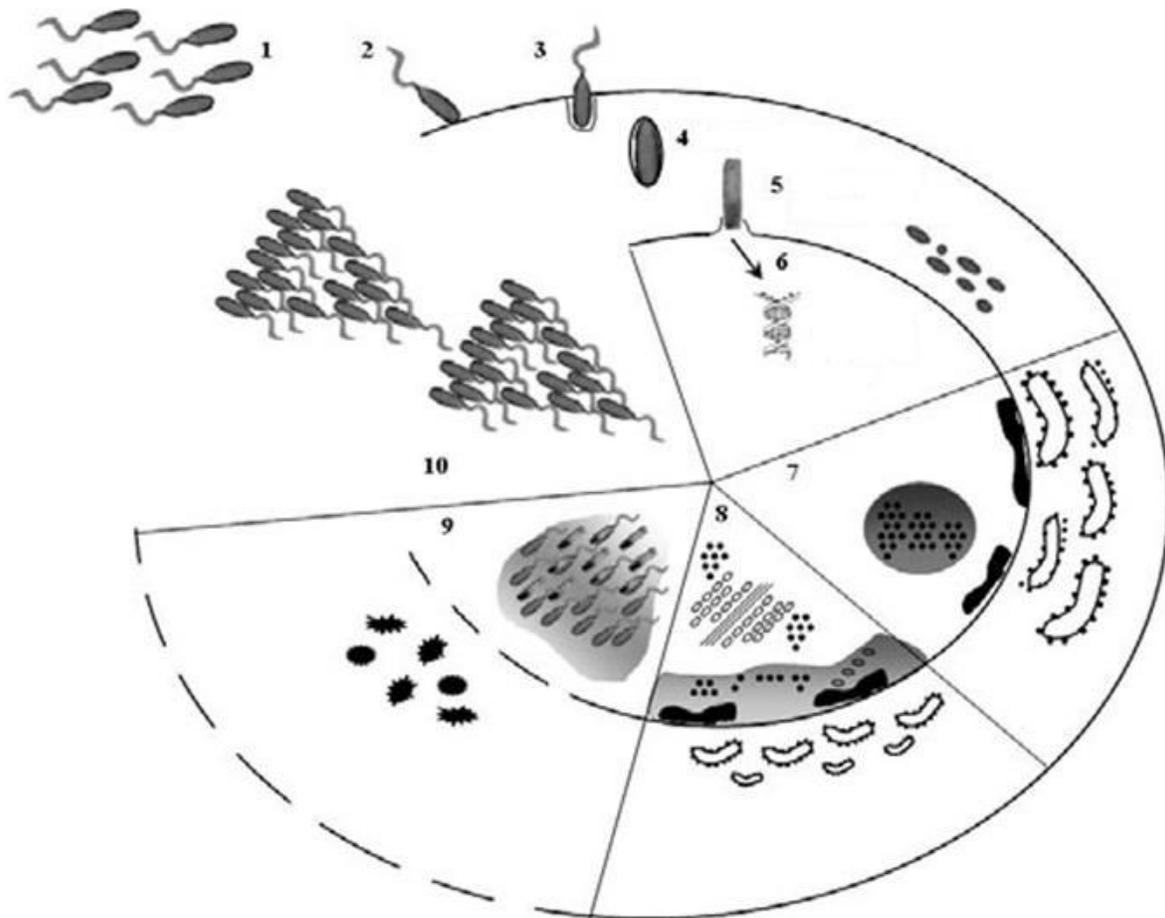
El virión maduro es de cilíndrico o elíptico en un corte longitudinal y de redondo a pentagonales o hexagonal en un corte transversal (Figura 2). El tamaño total de un virión oscila entre 275-335 nm x 116-138 nm; mientras que la cápside es de aspecto estriado y mide aproximadamente 246-296 nm x 75-93 nm y la envoltura oscila entre 7-9 nm. La envoltura de cada virión está conformada por cinco proteínas principales de las 39 estructurales <sup>(11,15, 16, 17)</sup>.



**a**  
**Figura 2.** Microscopía electrónica de transmisión de una sección de intestino de un acocil (*Procambarus clarkii*) a las 48 hs postinfección de WSSV. **2a.** Partículas virales localizadas a la periferia del núcleo, las cuales presentan un arreglo paracristalino. **2b.** Partículas virales agrupadas alrededor de estructuras en forma de vara, las cuales se localizan en el núcleo <sup>(11)</sup>.

### 2.2.3 CICLO VIRAL DEL WSSV.

El ciclo viral del WSSV aun no ha sido determinado. Sin embargo se ha descrito un modelo el cual propone la morfogénesis y ciclo viral <sup>(18)</sup>.



**Figura 3.** Modelo que propone la morfogénesis y ciclo viral de WSSV <sup>(18)</sup>.

**(1)** Partículas infecciosas de WSSV

**(2)** Los viriones se unen a receptores específicos localizados en la superficie de las células susceptibles; esto es mediante proteínas de envoltura

**(3)** WSSV ingresa a la célula.

**(4)** La envoltura de los viriones de WSSV probablemente se fusiona con el endosoma y la nucleocápside desnuda es transportada al núcleo. (Semejante al Baculovirus, Lua & Reid 2000).

**(5)** La nucleocápside desnuda se une a la membrana nuclear y el genoma del WSSV es liberado dentro del núcleo.

**(6)** Inicia la replicación del genoma del WSSV. Mientras tanto, en el citoplasma, las mitocondrias comienzan a degenerarse. (Wang *et al.* 1999a).

**(7)** En el núcleo, aparece el estroma virogénico temprano, conformado por material granular suelto. La cromatina celular se acumula cerca de la membrana nuclear y el retículo endoplásmico rugoso (RER) aumenta su actividad y tamaño.

**(8)** La cromatina marginada es transformada en una zona densa con forma de anillo (zona sombreada). El estroma virogénico es menos denso y comienza a formar vesículas, las cuales serán parte de la envoltura viral. Estas vesículas se forman probablemente con material encontrado en la zona densa en forma de anillo, como en el caso del Baculovirus (Lua & Reid 2000). Un nucleosoma viral también es observado en el estroma virogénico donde se encuentran estructuras filamentosas, las cuales son proteínas de la nucleocápside.

**(9)** Las nuevas partículas de WSSV son reunidas en el núcleo. Las envolturas vacías son llenadas con la nucleocápside. Mientras tanto, en el citoplasma los organelos comienzan a ser desintegrados y las membranas nuclear y celular se rompen (Wang *et al.* 1999a).

**(10)** Los nuevos viriones de WSSV están formados, completos y listos para ser liberados de la célula lisada, para comenzar así el ciclo en otras células susceptibles.

## **2.2.4 GENOMA**

El genoma del WSSV se encuentra conformado por una doble cadena circular de DNA (dsDNA) con aproximadamente 300 kb. <sup>(11, 14, 15, 19)</sup> con un total de 180 marcos de lectura abierto (Open Reading Frames-ORF) (11). Se han reportado tres diferentes variedades virales que provienen de China (WSSV-CN), Tailandia (WSSV-TH) y de Taiwan (WSSV-TW), donde, éste último es el más virulento. Estos han sido secuenciados completamente y presentan un tamaño de 305, 292 y 307 kb, respectivamente. La mayor diferencia entre estos tres aislados radica en dos regiones polimórficas de alrededor de 14 kb que no están relacionados con la virulencia <sup>(11, 20)</sup>.

La clasificación de los genes del WSSV se ha realizado con base en la codificación y función que asumen sus proteínas. A continuación se describen algunas de las proteínas del WSSV, así como su función en el grupo en el que se encuentran clasificadas.

### **1. GENES ESTRUCTURALES.**

Los genes estructurales codifican para la formación de la nucleocápside y juegan un papel muy importante en la virulencia del WSSV. Estudios recientes han demostrado que la proteína VP28 es la más abundante de la envoltura de este virus, además de que desempeña funciones primordiales; como la adhesión del virus hacia las células blanco en el camarón y permite la internalización completa en dichas células <sup>(21)</sup>. Mediante estudios realizados empleando secuencias peptídicas y anticuerpos específicos se han podido identificar otras proteínas en la envoltura del WSSV <sup>(22, 23)</sup>. Estas son la VP26, involucrada en la penetración del virus, <sup>(24)</sup> las VP24, VP281, VP76 y VP664 <sup>(4)</sup>. La clasificación del ICTV reconoce a cinco proteínas estructurales como las más importantes: VP28 y VP19 que son proteínas de envoltura; mientras que las VP15, VP24 y VP26 son proteínas de la nucleocápside <sup>(14)</sup>.

## **2. GENES FUNCIONALES O FISIOLÓGICOS.**

Estos genes se encuentran involucrados en las funciones del ciclo viral dentro del hospedero. Uno de estos genes es el *wdut* (antes denominado *wsv112*), que codifica para la dUTP pirofosfatasa (dUTPasa) <sup>(25)</sup>. Esta enzima juega un papel trascendente durante la infección y replicación viral, ya que mantiene bajas concentraciones de dUTP celular, previniendo la incorporación de uracilos al DNA cromosomal <sup>(4)</sup>. Otro gen es el *wsv191*, que codifica para la producción de nucleasas no específicas. Cabe mencionar que su secuencia pertenece al ORF 390 y la proteína codificada por este gen tiene función anti-apoptótica <sup>(26)</sup>.

## **3. GENES DE LATENCIA.**

A pesar de que no se ha descrito claramente un estado de latencia, se ha postulado que algunos genes están relacionados con este proceso. Estos genes se expresarán antes de la infección y proliferación del virus; homólogos en otros virus muestran su máxima tasa de actividad después de la transcripción en la síntesis de DNA viral. Se involucran primordialmente con la persistencia del virus en las células del huésped <sup>(27)</sup>. Los genes de latencia son los encargados de inactivar los genes del hospedero, siempre y cuando las condiciones de pH, salinidad y temperatura sean las adecuadas. Con la técnica de microarreglos se han identificado al menos tres genes que participan en el proceso de latencia, estos son: *wsv151*, *wsv366* y *wsv427* <sup>(28)</sup>.

#### 4. GENES DE REGULACIÓN TEMPORAL.

Durante la infección por WSSV una vez expresados los genes inmediatos tempranos o genes de regulación temporal, los productos de estos pueden tener función reguladora y/o servir como iniciadores de replicación viral. Estos genes no requieren de proteínas virales para ser transcritos, utilizan la maquinaria molecular del hospedero en las primeras horas después de la infección para la síntesis de proteínas. Por definición, la transcripción de un gen de regulación temprana debe ser insensible al tratamiento con ciclohexamida. Basados en este criterio, con la ayuda de microarreglos y transcripción reversa con reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), se han podido identificar los siguientes genes a partir del WSSV-TW: *ie1*, *ie2* e *ie3* de los ORF 126, 242 y 418, respectivamente

(29)

**Cuadro 1. Función de los genes del WSSV.**

<b>Tipo</b>	<b>Función/proteína codificada</b>	<b>Gene/ORF/Proteína</b>	<b>Referencia</b>	
Estructurales	Envoltura	VP19,VP466,VP281	Rout <i>et al.</i> (2004), Huang <i>et al.</i> (2002), Van Hulsten <i>et al.</i> (2002)	
	Envoltura/ interacción actina	VP26/VP22	Xie and Yang <i>et al.</i> (2005)	
	Envoltura/ataque y penetración celular	VP28/VP27.5	Yi <i>et al.</i> (2004)	
	Envoltura Nucleocápside	VP110/wssv092 VP15, VP24	Li <i>et al.</i> (2006) Witteveldt <i>et al.</i> (2005), Zhang <i>et al.</i> (2004) Van Hulsten <i>et al.</i> (2001a)	
	Nucleocápside/ ensamblaje Nucleocápside	VP664/ wssv419 VP35/wssv019/ORF687, ORF5	Leu <i>et al.</i> (2005) Tsai <i>et al.</i> (2004), Chen <i>et al.</i> (2002), Lo <i>et al.</i> (1999).	
	Envoltura, receptor citocina Interacción actina	VP136B/wssv524 VP76/ORF112 o 220 VP51C/wssv364	Tsai <i>et al.</i> (2004) Huang <i>et al.</i> (2005) Tsai <i>et al.</i> (2004)	
Funcionales	Met Prim/ATPasa S/ER	VP95/wssv502 VP75/wssv502 VP73/wssv275	Tsai <i>et al.</i> (2004) Tsai <i>et al.</i> (2004) Tsai <i>et al.</i> (2004)	
	Vitelogenina-like	VP60A/wssv381 VP60B/wssv474 VP55/wssv051	Tsai <i>et al.</i> (2004) Tsai <i>et al.</i> (2004) Tsai <i>et al.</i> (2004)	
	Hemocianina		VP53A/wssv067 VP53B/wssv171 VP53C/wssv324 VP51A/wssv292 VP41A/wssv293 VP41B/wssv298 VP39A/wssv362 VP39B/wssv449 VP38A/wssv314 VP38B/wssv449 VP36A/wssv134	Tsai <i>et al.</i> (2004) Tsai <i>et al.</i> (2004)
		Reacción fotosistemática	VP36B/wssv309 VP32/wssv253	Tsai <i>et al.</i> (2004) Tsai <i>et al.</i> (2004)
		RING-H2/ ligasa secuestrante	wssv249 VP24/wssv480 VP13A/wssv339 VP13B/wssv337 VP12B/wssv445 VP12A/wssv065 VP11/wssv394	Wang <i>et al.</i> (2005) Tsai <i>et al.</i> (2004) Tsai <i>et al.</i> (2004)
		dUTPasa, metabolismo de nucleótidos	wsv112/wdut	Liu & Yang (2005), Lie <i>et al.</i> (2005a)
		Nucleasa no específica	wsv191	Lie <i>et al.</i> (2005a)
		Metabolismo de nucleótidos	wsv067, 172, 188, 395	Yang <i>et al.</i> (2001)
		Anti-apoptótico	ORF390	Wang <i>et al.</i> (2004)
		Factor de transcripción putativo	ORF126/ <i>ie1</i>	Liu <i>et al.</i> (2005)
		-	ORF242/ <i>ie2</i>	Liu <i>et al.</i> (2005)
		-	ORF418/ <i>ie3</i>	Liu <i>et al.</i> (2005)
	GTP-ligasa	wsv447	Han <i>et al.</i> (2007)	
	Latencia	Intereacción de fosfatasa del camarón	ORF427	Lu & Kwan (2004)
		Auto-represor Protein cinasa	ORF89/ORF151 <i>Pk wssv</i>	Hossain <i>et al.</i> (2004) Liu <i>et al.</i> (2001)

Nomenclatura: Los genes aparecen en letras itálicas. El nombre de las proteínas se encuentra en letras mayúsculas. Mientras que los marcos de lectura abierto (ORF) están de acuerdo a los informes originales <sup>(4)</sup>.

### **2.2.5 HOSPEDEROS.**

El WSSV tiene la capacidad de infectar a numerosos invertebrados acuáticos, como los moluscos bivalvos, crustáceos decápodos (camarones, acociles, langostinos, langostas) <sup>(5, 8, 30)</sup>, crustáceos no decápodos (*Artemia*) y artrópodos no crustáceos (pizarreros de mar y larvas de insectos de la familia *Euphydrada*), pero sólo en los crustáceos decápodos, como los camarones peneidos el WSSV es letal y en los demás organismos solo actúan como reservorios naturales del virus <sup>(8, 11)</sup>.

### **2.2.6 VÍAS DE TRANSMISIÓN.**

Se han descrito tres vías de transmisión de la infección: vertical (transovárica), horizontal por consumo de tejidos infectados (canibalismo y depredación) y por contacto directo con corrientes acuáticas contaminadas <sup>(4,8)</sup>. Experimentalmente, los animales pueden ser infectados a través del alimento, inmersión o inyección directa con el virus <sup>(11)</sup>. Se ha reportado que la alimentación con productos o subproductos contaminados con WSSV, tales como la *Artemia* (*Artemia spp.*) pueden desencadenar la infección, ya que ésta se utiliza como alimento en las fases larvarias del camarón. También existe evidencia de que el WSSV se puede diseminar mediante utensilios de trabajo, vehículos, aves y otros animales <sup>(13)</sup>.

### **2.2.7 LESIONES MACRO Y MICROSCÓPICAS.**

La infección por WSSV puede llegar a causar hasta 100% de mortalidad en granjas camaroneras en un lapso de 7 a 10 días postinfección <sup>(6, 31)</sup>. Las lesiones macroscópicas observadas en camarones infectados son depósitos de sales de calcio (puntos blancos), que oscilan entre 0.5-2.0 mm de diámetro localizados en la cutícula del cefalotórax o caparazón <sup>(31, 32)</sup>. Sin embargo, se deben tomar en cuenta que factores ambientales como pH alcalino en el agua del estanque, altas concentraciones de sales de  $\text{Ca}^{2+}$  o

enfermedades bacterianas, pueden llegar a provocar dichas manchas blancas <sup>(6, 11, 33)</sup>, por lo que la presencia de estas manchas en la cutícula de los camarones no se debe considerar como diagnóstico definitivo del WSSV. Cabe resaltar que los organismos considerados como reservorios no presentan estas lesiones <sup>(11)</sup>.

Todos los estadios del camarón son susceptibles a la infección por WSSV, desde los huevos hasta los reproductores <sup>(8)</sup>, aunque se ha informado que las larvas y postlarvas en estadios inmaduros (nauplio, protozoa y misis) son resistentes al WSSV y aunque no se observen signos de enfermedad, éstos son positivos al virus mediante el diagnóstico por PCR <sup>(11)</sup>.

Los organismos afectados en estadios tempranos pueden presentar expansión de los cromatóforos cuticulares, lo cual se manifiesta como una coloración rosácea a marrón rojizo en la cutícula del cefalotórax <sup>(34)</sup>. Estos animales se pueden encontrar en los bordes de los estanques durante el día, reducen el consumo de alimento y los camarones enfermos están letárgicos, presentan nado lento y posteriormente mueren <sup>(31, 35)</sup>.

El WSSV puede infectar diversas células de origen mesodérmico (órganos linfoides, glándula antenal, tejido conectivo, hemocitos y tejido hematopoyético), ectodérmico (epidermis cuticular, intestino grueso, corazón, estómago y tejido nervioso) y endodérmico (epitelio del túbulo hepatopancreático y del intestino grueso) <sup>(5, 11, 31, 32)</sup>. Los principales tejidos afectados en estadios iniciales y en los cuales se detecta el virus son el estómago, branquias, epidermis cuticular y hepatopáncreas. La falla de estos órganos vitales es probablemente lo que causa la muerte de los camarones infectados <sup>(11)</sup>.

En el estudio histopatológico de los órganos afectados se pueden observar núcleos hipertrofiados con cuerpos de inclusión intranucleares amorfos y basofílicos, rodeados por un halo claro <sup>(5, 11, 31)</sup>. Además, se puede observar incremento de hemocitos hialinos y hemocitos atípicos <sup>(7)</sup>.

### **2.3 MECANISMOS INMUNOLÓGICOS EN CAMARONES CONTRA AGENTES INFECCIOSOS.**

Los invertebrados marinos en su ambiente natural están en constante contacto con una gran diversidad de microorganismos, mismos que pueden constituir una seria amenaza para su sobrevivencia. Sin embargo, el evidente éxito de este grupo zoológico a lo largo de más de 500 millones de años de su historia evolutiva, confirma la presencia de un sistema inmunológico capaz de protegerlos contra la invasión de los agentes causantes de enfermedades <sup>(6)</sup>. La primera línea de defensa de los camarones es proporcionada por la presencia de un caparazón externo o exoesqueleto, que funciona como barrera físico-química. Además, todo el tracto digestivo de estos animales se encuentra revestido por una capa quitinosa; la cual, ofrece un ambiente ácido y lleno de enzimas, capaces de inactivar y digerir la mayoría de los microorganismos que no son parte de su microbiota natural <sup>(36)</sup>.

Cuando las barreras físico-químicas son traspasadas y/o no son suficientes para contener la penetración de agentes patógenos, se desencadena en el hospedero una serie de reacciones inmunológicas complejas con el objetivo de neutralizar y eliminar a los agentes invasores. Es importante resaltar que a diferencia de los vertebrados, los crustáceos disponen solamente de un sistema inmunológico innato, el cual es filogenéticamente más antiguo y se puede encontrar en todos los organismos multicelulares, incluyendo invertebrados y plantas; mientras que el sistema inmunológico adaptativo es propio de vertebrados y se caracteriza por la presencia de una afinidad de receptores y anticuerpos altamente específicos y por la inducción de células de memoria, lo que garantiza una respuesta altamente eficiente y específica en contra de diversos patógenos <sup>(6, 36)</sup>.

Debido a que el sistema inmunológico de los crustáceos posee un sistema circulatorio abierto o semi-abierto, esto significa que la hemolinfa (equivalente a vertebrados a la sangre) no está delimitada por pequeños vasos sanguíneos o capilares. En la hemolinfa son transportados continuamente nutrientes, excretas, oxígeno, hormonas y otras moléculas importantes para los diferentes órganos. Además, la hemolinfa está compuesta por una fracción celular y por una fracción humoral constituida por el plasma que contiene diferentes factores humorales. La fracción celular se encuentra encabezada por células inmunocompetentes o hemocitos, los cuales se encargan de la fagocitosis de microorganismos, formación de cápsulas y nódulos en torno a los invasores así como mecanismos citotóxicos y/o degenerativos intracelulares, los cuales se encargan de degradar y eliminar patógenos. La activación de los hemocitos resulta por el proceso de extensión y degranulación, ocurriendo así la liberación de una gran variedad de efectores inmunológicos para el plasma. Los hemocitos se clasifican de acuerdo a su morfología en hialinos, semi-granulares y granulares <sup>(6)</sup>.

Dentro de los principales mecanismos encargados de ofrecer protección a los camarones se encuentran: sistema fagocítico y de encapsulamiento, coagulación de la hemolinfa, melanización mediada por el sistema pro-fenol oxidasa, reconocimiento y aglutinación celular mediados por lectinas, producción de formas reactivas de oxígeno y nitrógeno, péptidos antimicrobianos el silenciamiento génico o interferencia por RNA (RNAi) <sup>(6)</sup>.

### 2.3.1 SILENCIAMIENTO GÉNICO O INTERFERENCIA POR RNA (RNAi)

Dentro de las principales funciones que se le reconocen al RNA es como intermediario en la expresión de genes, transmitiendo información entre el DNA y la maquinaria de la producción de proteínas (RNA mensajero = RNAm). También funciona como elemento decodificador que permite la traducción de un lenguaje de nucleótidos a un lenguaje de aminoácidos (RNA de transferencia = RNAt) y como parte estructural de la maquinaria que produce las proteínas (RNA ribosomal = RNAr). Recientemente, han sido descritas nuevas funciones del RNA: Andrew Fire y Craig Mello demostraron que tras la inyección de una molécula 100% complementaria al RNAm y doble de RNA (dsRNA, double-stranded), tiene un efecto directo en el fenotipo del organismo, lo cual se llamó silenciamiento génico por RNAi <sup>(37)</sup>.

Las primeras investigaciones sobre el silenciamiento por RNAi fueron realizadas en petunias, en las que se trataba de sobreexpresar a la enzima que produce el color púrpura (chalcona sintasa). Para realizar esto, se introdujeron varias copias del gen que codifica para esta enzima esperando encontrar que las plantas sobre expresaran a la chalcona sintasa fueran púrpuras. Sin embargo, se obtuvieron flores sin color o con parches blancos. Al analizar los niveles de la enzima se encontró que eran 50 veces menores a los de las plantas originales <sup>(38)</sup>. Esta observación implicó que los genes que se introdujeron no se estaban expresando, pero también que el gen natural de la planta dejaba de expresarse, por esta razón al fenómeno se le llamó co-supresión. Un fenómeno equivalente fue descrito posteriormente en el hongo *Neurospora crassa*; al que se le llamó *quelling* ("detener abruptamente"). Estas observaciones se comprendieron mejor en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* <sup>(39, 40)</sup>, al cual se le introdujo dsRNA del gen *unc-22*, implicado en el proceso de contracción muscular <sup>(40)</sup>. Esto se reflejó como espasmos marcados, lo cual afectaba a su progenie, por lo que este fenómeno se le

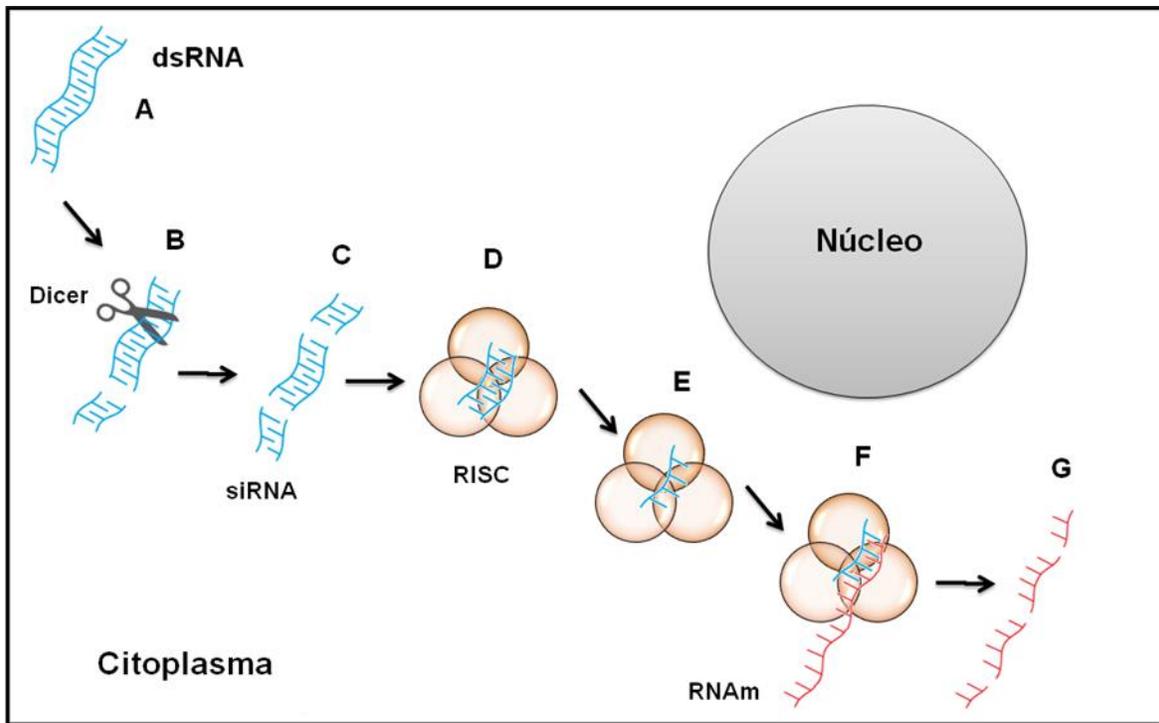
denominó silenciamiento de genes o silenciamiento post-transcripcional. Este silenciamiento era específico de secuencia, es decir, que la expresión del gen que presenta la secuencia 100% complementaria que el dsRNA se inhibió. Esto explicaba tanto a la co-supresión como el *quelling*. Por este trabajo, los investigadores Fire y Mello recibieron el premio Nobel de Medicina en el 2006

Estos resultados arrojaron las siguientes conclusiones <sup>(39)</sup>:

1. El silenciamiento génico es sólo eficiente tras la administración de moléculas de dsRNA.
2. El silenciamiento es específico del RNAm 100% complementario al dsRNA, otros RNAm no serán afectados.
3. El dsRNA debe corresponder a la secuencia madura de RNAm, sin intrones o secuencias promotoras.
4. El RNAm blanco es degradado.
5. Sólo algunas moléculas de dsRNA son suficientes para lograr un silenciamiento efectivo.
6. El efecto del dsRNA puede extenderse a otros tejidos e inclusive a la progenie.

Mecanismo de interferencia por RNA.

El mecanismo de interferencia por RNA se desencadena cuando una molécula de dsRNA es cortada en pequeños fragmentos de 21 a 23 nucleótidos, mediante enzimas “Dicer” que pertenecen a la familia de las RNAsa III. Estos pequeños fragmentos de dsRNA son conocidos como RNA de interferencia cortos (siRNA), los cuales son incorporados al complejo al RISC (complejo de inducción de silenciamiento). La cadena antisentido del fragmento de dsRNA localiza al RNAm para así fragmentarlo. Es importante resaltar que si no existe un 100% de compatibilidad no se puede dar este apareamiento <sup>(40, 37)</sup>. El mecanismo de interferencia por RNA se esquematiza en la Figura 4.



**Figura 4.** Esquema del mecanismo de RNAi. Imagen obtenida y modificada de la revista Howard Hughes Medical Institute, 2007 annual report, pp 12.

- A. Se introduce el dsRNA con la secuencia blanco a la célula.
- B. El dsRNA se une a enzimas Dicer (Rnasas III, ATP dependiente)
- C. La enzima Dicer corta la cadena de dsRNA en fragmentos de 21 a 23 nucleótidos (conocidos como siRNA).
- D. Los siRNA son incorporados al complejo de inducción de silenciamiento de RNA (RISC). Este se encuentra formado por proteínas del tipo Argonata, Helicasas, nucleasas exonucleóticas y endonucleóticas, además de una secuencia de actividad de búsqueda homóloga.
- E. El fragmento antisentido de la cadena del siRNA se queda incorporado al RISC, para buscar su secuencia complementaria de RNAm.
- F. El RISC con la cadena antisentido del siRNA se une a su RNAm complementario, para provocar su degradación.
- G. El RNAm complementario es fragmentado, inhibiendo así la síntesis de proteínas. Debido a la escisión del RNAm blanco por enzimas endonucleóticas.

Al descubrirse esta tecnología y aplicarse al control de WSSV se han encontrado posibles soluciones para combatir ésta enfermedad, como una protección de hasta 60 %, mediante la administración por vía oral de pellets con bacterias inactivadas que sobre-expresaban dsRNA específico de WSSV <sup>(6, 31, 41)</sup>.

## 2.4 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.

En la actualidad existen pocos métodos disponibles para la detección de WSSV. El ensayo de aglutinación pasiva reversa detecta al virus en tejido estomacal homogeneizado. Esta prueba utiliza una alta densidad de partículas de látex y anticuerpos policlonales en formato de ELISA de flujo lateral. <sup>(25)</sup> Dentro de los métodos serológicos, se encuentra la producción de anticuerpos policlonales contra WSSV, los cuales se unen a proteínas de superficie del virus <sup>(26)</sup> El PCR es una técnica muy sensible y poderosa para la detección de WSSV. Ésta se utiliza para estimar la prevalencia del virus en granjas e identificar reservorios; además, actualmente esta técnica es la indicada por la norma mexicana (NOM-030-PESC-2000) para expedir certificados en el país. Existen otros métodos para el diagnóstico de WSSV, como la hibridación *in situ*, que es una técnica que permite detectar ADN o ARN de algún organismo en el interior de las células, permeabilizándolas de tal forma que se facilita la entrada de una sonda. Esto se realiza en tejidos fijados y procesados mediante la técnica de inclusión en parafina. También la Organización Internacional de Epizootias (OIE) <sup>(8)</sup>, recomienda la utilización de ensayos con anticuerpos policlonales y monoclonales <sup>(4, 8)</sup>.

La OIE ha propuesto la elaboración de métodos para poder realizar un diagnóstico presuntivo, uno de estos se basa en el análisis en fresco de las muestras sin teñir, las cuales serán observadas en un microscopio de campo oscuro. Asimismo, considera la elaboración de bioensayos de reto, pero su aplicación es limitada a los laboratorios con acceso a camarones libres del WSSV. Esta prueba consiste en realizar un estudio con seres vivos (organismos “blanco”) en los que se busca reproducir la enfermedad. Este desafío requiere de un tejido infectado con WSSV o sospechoso, para poder elaborar el inóculo que se le administrará *per os* (vía oral) o intramuscular a organismos “blanco”, con

la finalidad de que éstos desarrollen la enfermedad en un tiempo previamente establecido, para posteriormente confirmarla mediante otras técnicas <sup>(8)</sup>.

Los métodos de confirmación para WSSV aceptados por la OIE son:

1. Histopatología (HE).
2. PCR anidada de tejidos y/o hemolinfa.
3. Ensayos con anticuerpos.
4. Hibridación DNA *in-situ*.
5. Microscopía electrónica de transmisión.

## **2.5 ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DE WSSV**

Dentro de las formas aplicables para el control de enfermedades virales se encuentran: El establecimiento de buenas prácticas de manejo; las cuales, deben estar dirigidas a la aplicación de medidas de bioseguridad durante todo el cultivo y garantizar un buen manejo acuícola y responsable con el ambiente <sup>(5)</sup>. Dentro de las principales se pueden mencionar: aislar reproductores y someterlos a exámenes de laboratorio, certificar postlarvas libres de enfermedades, utilizar productos químicos y soluciones aprobadas para su uso en acuicultura, instalar sistemas de desinfección, tratar el efluente procedente del laboratorio antes de descargarlo a cuerpos de agua, implementación de planes HACCP dentro de las granjas, preparación de estanques para su siembra,

La NOM-030-PESC-2000 hace especial hincapié, “en tener cuidado con la introducción al territorio nacional, así como la movilización en el mismo, de crustáceos vivos, muertos, sus productos o subproductos, en cualquier presentación, así como de organismos en estado latente, como los quistes de *Artemia*, bien sea para fines de cultivo,

comercialización, industrialización o consumo, ya que éstos representan un alto riesgo de dispersión de éste y otros agentes infecciosos, los cuales pueden ocasionar cuantiosas pérdidas a la acuicultura, así como, a las poblaciones naturales de crustáceos, representando, por tanto, un peligro potencial de desequilibrio ecológico”.

Existen otras tecnologías aplicables para el control de enfermedades virales pero éstas no han sobresalido lo suficiente para ser realmente aplicables. Dentro de estas tecnologías se encuentra la aplicación de inmunoestimulantes <sup>(6)</sup> y la selección genética <sup>(5, 6)</sup>.

## **2.6 INACTIVACIÓN DEL WSSV.**

La desinfección de instalaciones, materiales, equipos y vehículos se llevará a cabo mediante la aplicación de químicos, utilizando concentraciones y tiempo suficiente de exposición para destruir al virus. Todos los materiales e instalaciones se deben tratar con una solución de hipoclorito de sodio a razón de 50mg/L (50 ppm) y esperar por lo menos 30 minutos antes de eliminar el desinfectante. Para el caso de aguas residuales, se aplica el tratamiento con el hipoclorito de sodio por 30 minutos, seguido de un tratamiento con yodo a 200 ppm <sup>(13)</sup>.

### **3. JUSTIFICACIÓN.**

Debido a que las enfermedades virales son devastadoras en el cultivo de camarones y el más patógeno de los virus descritos en camarones peneidos es el WSSV, se están tratando de implementar nuevas y eficientes estrategias que ayuden a controlar la enfermedad. El RNAi se ha propuesto como un potente y eficaz mecanismo antiviral que se encuentra altamente conservado en camarones. Por tal motivo se pretende determinar las diferencias histopatológicas en camarones sometidos y no sometidos a silenciamiento génico y expuestos al WSSV, tales diferencias no se han descrito en la literatura hasta la fecha.

### **4. HIPÓTESIS.**

El grado de lesión provocado por la infección con el virus de la mancha blanca en camarones sometidos a silenciamiento génico con dsRNA será menor en comparación con los camarones no sometidos a silenciamiento génico.

### **5. OBJETIVO GENERAL.**

Determinar las diferencias en las lesiones provocadas por el virus de la mancha blanca mediante el estudio histopatológico, en camarones sometidos y no sometidos a bioensayos de silenciamiento génico con dsRNA con la finalidad de demostrar el efecto antiviral del RNAi.

#### **5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Confirmar la presencia del virus de la mancha blanca en los organismos experimentales mediante la técnica de PCR.
- Identificar las lesiones microscópicas ocasionadas por el virus de la mancha blanca en camarones tratados y no tratados con dsRNA.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Camarones

Se utilizó un lote de 46 camarones *L. vannamei*, con un peso promedio de 8 g ( con una desviación estándar de 2g) los cuales se encontraban en un estanque de agua marina (35 g/l, temperatura  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste (CIBNOR) en la Paz, de donde fueron trasladados vía aérea, en bolsas de plástico del número 300 a una densidad de 30 camarones por bolsa con 15 L, a las cuales se les saturó de oxígeno y se almacenaron en una hielera (Polar® con capacidad 114 L) y se llevaron hacia las instalaciones del Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo A.C.- Unidad Mazatlán en la zona de Acuicultura y Manejo Ambiental (CIAD). Los camarones se alimentaron con cuatro pellets por la mañana y cuatro por la tarde (Camaronina 25% proteína, Purina, México). El estatus sanitario se determinó colectando muestras individuales de hemolinfa, la cual fue recolectada en una jeringa de 1 mL que contenía 500  $\mu\text{l}$  de anticoagulante (450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, 20 mM EDTA- $\text{Na}_2$ ) (Vargas- Albores *et al.*, 2005). Con la técnica de PCR anidado se determinaron libres para WSSV, TSV, YHV, IHNV (IQ2000™ Farming IntelliGene Tech Co.), siguiendo las condiciones e instrucciones del fabricante.

### 6.2 Virus (WSSV).

A partir de camarones (*L. vannamei*) infectados provenientes del CIAD, se preparó el inóculo del WSSV siguiendo el método modificado de Escobedo-Bonilla *et al.*, (2005), el cual se describe brevemente: se retiró el exoesqueleto y el hepatopáncreas, de los camarones infectados; dichos órganos se suspendieron en 4 volúmenes de solución de fosfatos fría (PBS) (NaCl 137 mM, KCl 2.69 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10.16 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.37 mM, pH 7.4), se homogenizó con un mezclador (Braun multiquick) para obtener fragmentos de

tejido más finos se utilizó un mezclador (POLYTRON modelo PT 1300). La suspensión obtenida fue clarificada mediante dos centrifugaciones consecutivas de 3,000 x g y 10,600 x g, respectivamente. La suspensión obtenida se filtró a través de membranas porosas (0.45 µm) con la ayuda de una bomba de vacío; se prepararon en alícuotas de 1.6 ml y se conservaron a -80°C, hasta su uso.

### **6.3 Titulación viral y dosis de reto.**

De las muestras almacenadas en alícuotas se tomó una para determinar el título viral mediante la técnica de PCR en tiempo real, siguiendo el protocolo del fabricante (IQ Real 2000™ Farming IntelliGene Tech Co.). A cada camarón se le administró 1 mL de inóculo viral que contenía 14,000 copias virales por mL; este se aplicó en la parte dorsal del 4to. segmento abdominal, con jeringas de insulina de 1 mL.

### **6.4 Diseño experimental y condiciones.**

El experimento se dividió en cuatro grupos cada uno con cuatro camarones, excepto el grupo A (control negativo) conformado por 10 organismos. En el grupo B estaban los camarones tratados con dsRNA para vp28, en el grupo C los camarones tratados con dsRNA para orf89 y en el último (grupo D) se encontraban los camarones que no recibieron tratamiento con dsRNA (controles positivos) (Cuadro 2). Cada grupo estaba conformado por 4 organismos, los cuales se encontraban en peceras de vidrio con capacidad para 40 L, mantenidos con un volumen de 30 L. Cada experimento se realizó por triplicado.

Los camarones se mantuvieron bajo las siguientes condiciones:

Se utilizó agua marina natural (35 ppm), la cual se dejaba sedimentar en tanques de fibra de vidrio (Rotoplast ®) con capacidad para 450 L por 12 horas. Para abastecer a las

peceras se diseñó un sistema por donde el agua sedimentada pasaba por dos filtros uno de 5 µm y otro de 1 µm. Inmediatamente después el agua que salía de estos filtros pasaba por un sistema de esterilización de rayos UV. El agua sometida a este procedimiento es la que abastecía a las peceras. La temperatura se mantuvo en 25 ± 2°C.

**Cuadro 2.** Esquema de los grupos del diseño experimental.

<b>Grupo</b>	<b>Réplica 1</b>	<b>Réplica 2</b>	<b>Réplica 3</b>
<b>A</b> (control negativo)	ds- WSSV -	ds- WSSV -	ds- WSSV -
<b>B</b>	vp28 ds+ WSSV +	vp28 ds+ WSSV +	vp28 ds+ WSSV +
<b>C</b>	ORF89 ds+ WSSV +	ORF89 ds+ WSSV +	ORF89 ds+ WSSV +
<b>D</b> (control positivo)	ds - WSSV +	ds - WSSV +	ds - WSSV +

### 6.5 Síntesis de la doble cadena.

La síntesis del dsRNA específico se realizó *in vitro* utilizando un kit comercial (BLOCK-iT™ rnal TOPO®, Invitrogen). Además, se utilizaron iniciadores específicos para vp28, ORF89 y un control de interno de dsRNA (LacZ) (Cuadro 3). La formación del dsRNA fue monitoreada mediante electroforesis en geles de agarosa al 8%. (El procedimiento detallado de la doble cadena se muestra en el apéndice 1).

**Cuadro 3.** Iniciadores utilizados para realizar las amplificaciones.

Gen	Primer	Secuencia (5' → 3')	Producto de PCR (bp)
vp28	vp28F3	AACTGCAGATGGATCTTTCTTTC	610
	vp28R3	AACTGCAGTTACTCGGTCCTCAG	
ORF89	orf89F	AGGACCCGATCGCTTACTTTGA	400
	orf89R	CTCCCTCCCTTGCGAACTTG	
β-actina	F2	GAAGTAGCCGCCCTGGTTG	416
	R2	CGGTTAGCCTTGGGGTTGAG	
LacZ(control negativo)	Forward 2	ACCAGAAGCGGTGCCGAAA	1000
	Reverse 2	CCACAGCGGATGGTTCGGAT	
T7	BLOCK-it T7	GATGACTCGTAATACGACTCACTA	

### 6.5.1 Dosis de dsRNA.

A cada camarón se le administró 4 µg de dsRNA específico del gen vp28 y orf89 el cual se diluyó en solución PBS y se llevó a un volumen de 150 µl. Ésta se hizo en la parte dorsal del 4to. segmento abdominal, con jeringas de insulina de 1 mL.

Para el bioensayo primero se administró a cada camarón el dsRNA específico con la dosis previamente establecida y 48 horas después se inoculó el virus.

## **6.6 Eficacia de la interferencia por dsRNA y evaluación de la infección por WSSV.**

La eficacia del dsRNA construido fue correlacionada con la mortalidad acumulada de cada tratamiento y comparada con los controles positivos. La infección por WSSV fue determinada por la aparición de los signos clínicos y la mortalidad en los camarones tratados y por la presencia de lesiones macroscópicas y microscópicas. Para determinar si había silenciamiento de las secuencias específicas, se realizó la PCR. Empleando los iniciadores mencionados en el cuadro 3 y las condiciones referidas en el apéndice 1.

## **6.7 Histopatología.**

Para tomar las muestras para el estudio histopatológico se clasificaron a los organismos infectados y no infectados con WSSV en tres etapas de enfermedad con la finalidad de poder encontrar lesiones y evitar así cambios autolíticos que interfirieran este estudio.

Fase 1. Organismos que iniciaban con los signos de enfermedad, los criterios que se tomaron en cuenta fueron:

- A) Nado errático.
- B) No consumo de alimento.
- C) Tracto intestinal vacío.
- D) Coloración roja.

Fase 2. Organismos moribundos. No había respuesta a estímulos y su actividad era baja (estado letárgico).

Fase 3. Organismos muertos.

Para evitar la autólisis de los tejidos, se decidió tomar a los organismos moribundos (Fase 2). Sin embargo para el estudio histopatológico se analizaron a todos los camarones. La evaluación de los camarones terminó cuando el último de los camarones de los controles positivos fuera tomado para el estudio histopatológico. Estos se fijaron en una solución de Davidson (etanol 95%, formaldehído 39%, ácido acético glacial, agua salada), la cual se inyectó en sus cuerpos (hepatopáncreas, músculo) con jeringas de insulina de 1 mL. Después fueron sumergidos en frascos de plástico con esta misma solución durante de 24 a 72 hs. Posteriormente fueron enjuagados con agua corriente para eliminar el exceso de fijador y se añadió una solución de etanol al 70 %, dejándose en ésta por un día. A partir de aquí, los organismos fueron seccionados colocando el cefalotórax y branquias en cajas de plástico con tapa (Simport, Canada). Las muestras fueron procesadas mediante la técnica convencional de histología y los tejidos fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina (HE).

Para observar las alteraciones patológicas provocadas por el WSSV, se revisaron los tejidos de todos los organismos de los cuatro grupos. La presencia de las lesiones características de la infección por WSSV fue confirmada mediante la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares anfófilicos en branquias y estómago. Para determinar la severidad de las lesiones se utilizó el sistema de Lightner <sup>(31)</sup>, el cual se basa en un rango de G0 a G4. En el Grado 0 (G0) no se observan lesiones, el G1 indica que  $\leq 25\%$  del órgano se encuentra afectado, G2 muestra que hay un daño tisular que oscila entre el 25 y 50%, G3 indica un daño entre el 50 al 75 % y en el G4  $\geq 75\%$  del órgano se encuentra afectado con cuerpos de inclusión intranucleares y necrosis. A las lesiones encontradas en otros órganos se les designó leve (+), moderado (++) y grave (+++).

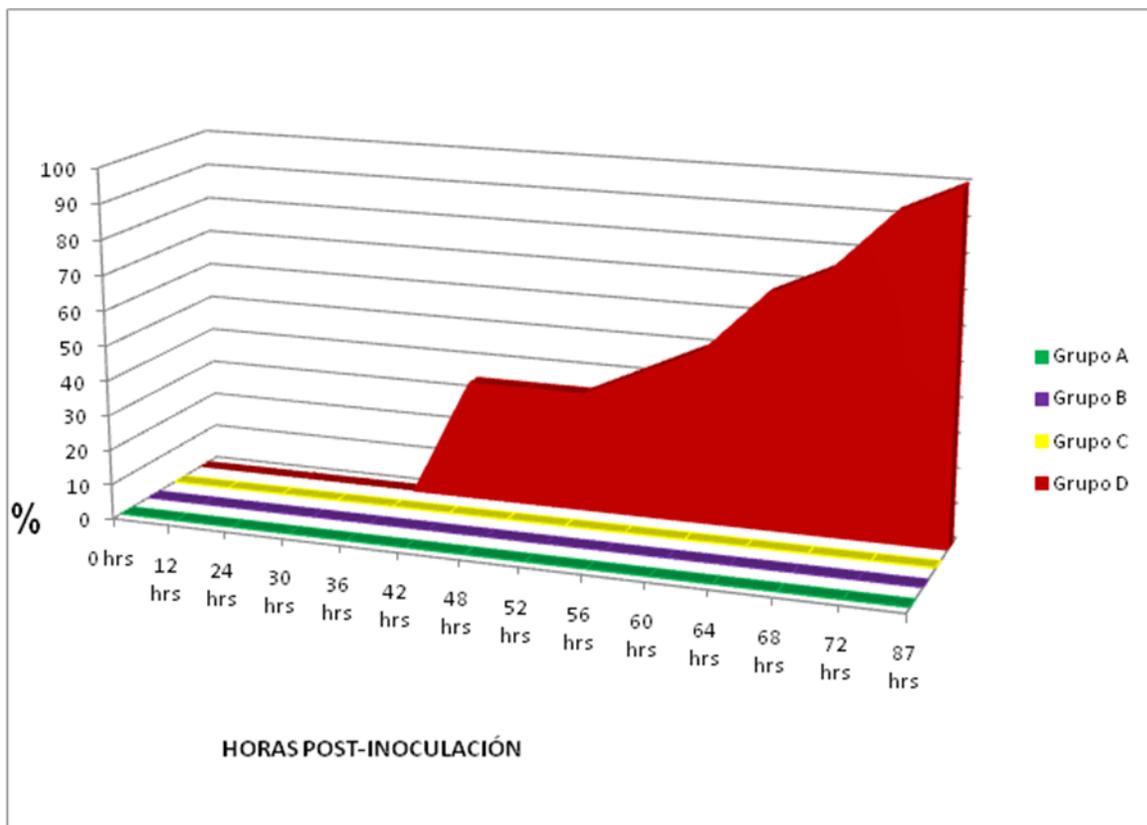
## **6.8 Análisis estadístico.**

Los resultados de las observaciones realizadas en los órganos (branquias y estómago) de los camarones sometidos y no sometidos a silenciamiento génico fueron analizados mediante la prueba de Xi cuadrada, utilizando el paquete estadístico JMP.

## 7. Resultados.

### Eficacia *in vivo* de la interferencia por dsRNA.

En la figura 5 se muestra el porcentaje de mortalidad acumulativa desde la hora 0, que fue cuando se inoculó el virus, hasta las 87 hs cuando murió el último de los camarones que no recibió tratamiento de dsRNA (controles positivos). Ninguno de los camarones que recibieron tratamiento (dsRNA-vp28, grupo B y dsRNA-orf89, grupo C) murió.



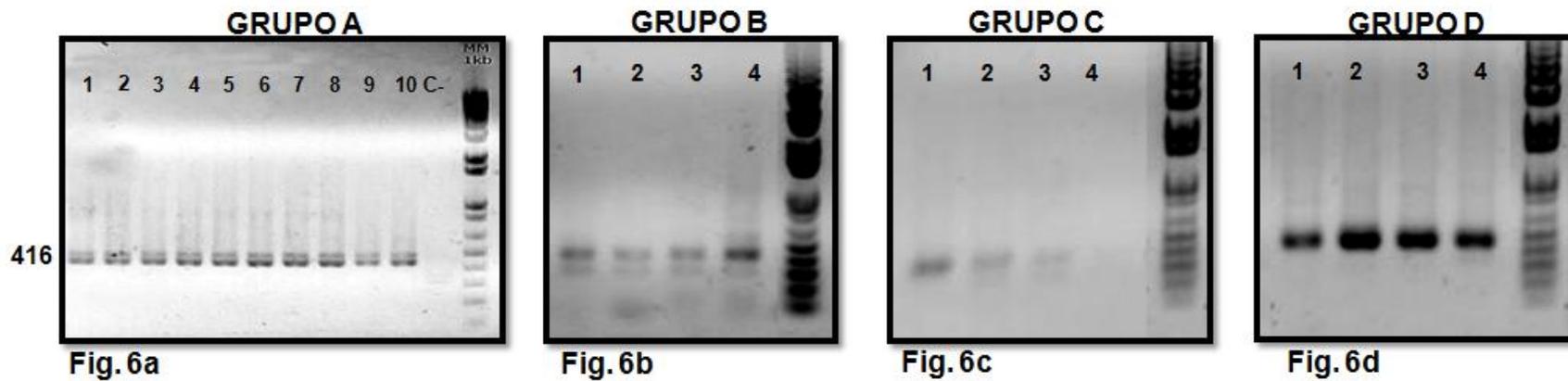
**Figura 5. Mortalidad acumulada.** En esta gráfica se muestra el porcentaje de mortalidad acumulativa de los diferentes grupos desde la inoculación viral (0hs) hasta que el último organismo de los controles positivos se tomó para ser muestreado (87hs).

### **Eficacia de la interferencia por dsRNA.**

Para examinar la habilidad del RNAi para suprimir la expresión del gen del WSSV, se seleccionó la VP28, la cual es una proteína estructural encargada de la adhesión en las proteínas del hospedero y ORF89, que se considera tiene actividad dentro de la represión de los genes del hospedero (genes de latencia).

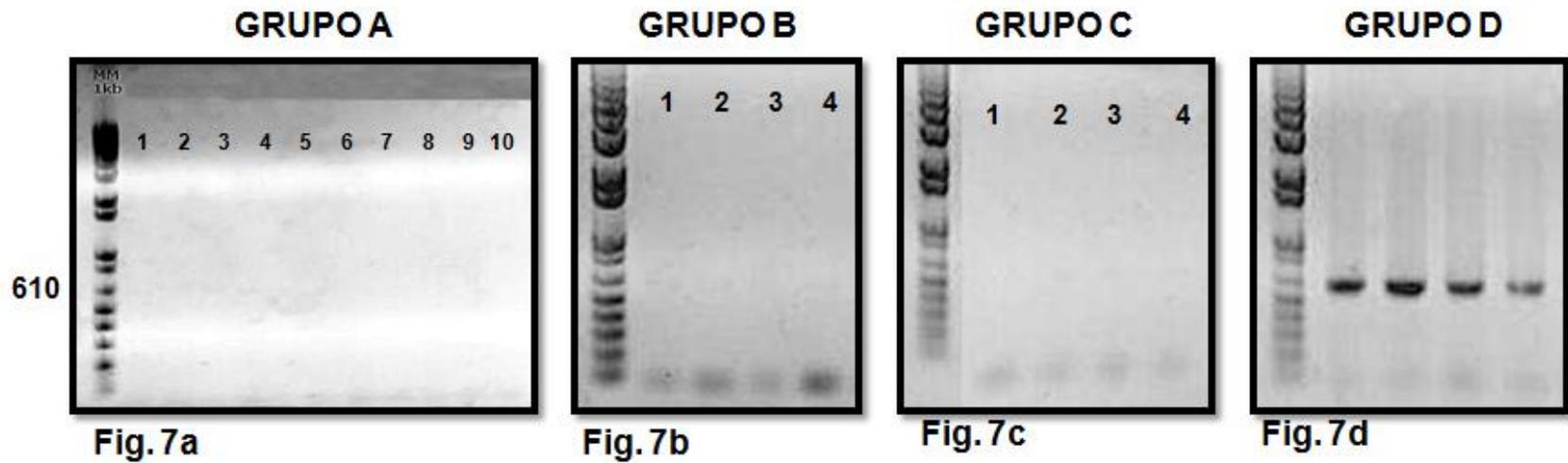
Los resultados de la PCR de vp28 (figura 7b) y orf89 (figura 8c), indican una inhibición de la expresión para estos genes por el dsRNA específico a las 87 hs post-inoculación (dsRNA-vp28 y dsRNA-orf89) cuando se comparan con respectivos controles positivos (figura 7d y figura 8d). La inhibición de la expresión de la VP28 en camarones tratados con dsRNA-orf89 a las 87 hs post-inoculación (figura 7c), así como el silenciamiento de orf89 en camarones tratados con dsRNA-vp28 a las 87 hs post-inoculación (figura 8c) se evaluó con la PCR. Los resultados revelan que en ambas condiciones se observó el efecto de silenciamiento para secuencias no específicas en comparación con sus controles positivos (figura 7d y figura 8d).

PCR  $\beta$ - ACTINA.



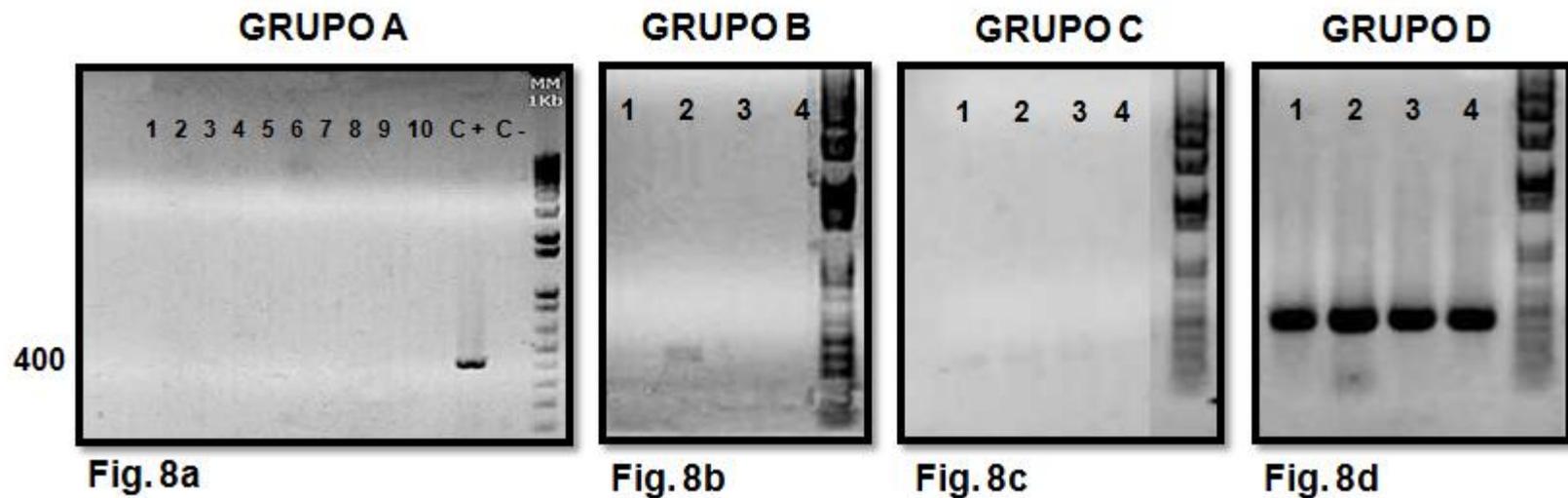
**Figura 6.** Análisis de PCR de la secuencia  $\beta$ -actína, como control de PCR. En ésta se observa la expresión del gen  $\beta$ -actína, cuyo producto esperado de 416 pb. De izquierda a derecha: carriles correspondientes a los camarones que conformaban este grupo y marcador de peso molecular 1 kb. **Fig 6a.** Controles negativos (dsRNA- y WSSV -). **Fig 6b.** Grupo tratado con dsRNA-vp28 y WSSV+. **Fig 6c.** Grupo tratado con dsRNA-orf89 y WSSV +. **Fig 6d.** Controles positivos (dsRNA-y WSSV +).

PCR vp28



**Figura 7.** Análisis de PCR de la secuencia vp28, la cual se realizó, para determinar la efectividad del silenciamiento por el dsRNA específico, cuyo producto esperado de 610 pb. De izquierda a derecha: carriles correspondientes a los camarones que conformaban este grupo y marcador de peso molecular 1 kb. **Fig. 7a.** Controles negativos (dsRNA - y WSSV -). **Fig. 7b.** Grupo tratado con dsRNA-vp28 y WSSV+. **Fig 7c.** Grupo tratado con dsRNA-orf89 y WSSV +. **Fig 7d.** Controles positivos (dsRNA -y WSSV +).

PCR ORF89



**Figura 8.** Análisis de PCR de la secuencia ORF89, la cual se realizó, para determinar la efectividad del silenciamiento por el dsRNA específico, cuyo producto esperado de 400 pb. De izquierda a derecha: carriles correspondientes a los camarones que conformaban este grupo y marcador de peso molecular 1 kb. **Fig. 8a.** Controles negativos (dsRNA - y WSSV -). **Fig. 8b.** Grupo tratado con dsRNA-vp28 y WSSV+. **Fig 8c.** Grupo tratado con dsRNA-orf89 y WSSV +. **Fig 8d.** Controles positivos (dsRNA-y WSSV +).

## **Estudio histopatológico.**

Las lesiones provocadas por el WSSV se encuentran bien determinadas como en estómago y branquias ya que se consideran como los principales órganos blancos del virus. Sin embargo las lesiones en estos órganos de animales tratados con dsRNA específico no han sido descritas. Por tal motivo, en este estudio se evaluaron las diferencias histológicas en los camarones tratados con dsRNA-vp28 y dsRNA-orf89 y expuestos al virus.

La ausencia de lesiones como cuerpos de inclusión intranucleares y necrosis en el órgano linfoide, ubican a los camarones tratados con dsRNA específico para vp28 y orf89 dentro del grado G0 con base en la clasificación de Lightner. Estos no muestran diferencias significativas ( $p= 0.001$ ) entre ellos (cuadro 4). Sin embargo, cuando se comparan con su control positivo estos presentan el mayor grado de lesión (G4).

Los organismos tratados con dsRNA tanto para vp28 como para orf89 presentaron leve necrosis del músculo, granulomas en hepatopáncreas, así como hiperplasia de células endoteliales en el corazón (figura 14b). Mientras que en los controles positivos además de las lesiones clásicas producidas por WSSV se encontró necrosis grave del órgano linfoide con numerosos cuerpos de inclusión intranucleares y en branquias parásitos flagelados (*Zoothamnium sp.*)

En los cuadro 5, 6, 7 y 8 se muestran los grados de lesión con base al tratamiento.

## Resultados del análisis estadístico.

**Cuadro 4.** Diseño experimental y grados de lesión (estadística).

	<b>Grupo A Controles negativos</b>	<b>Grupo B (dsRNA-vp28 WSSV+)</b>	<b>Grupo C (dsRNA-ORF89 WSSV+)</b>	<b>Grupo D Controles positivos</b>
<b>Organismos observados</b>	10	12	12	12
<b>Lesión en estómago</b>	G0 <sup>a</sup>	G0 <sup>a</sup>	G0 <sup>a</sup>	G4 <sup>b</sup>
<b>Lesión en branquias</b>	G0 <sup>a</sup>	G0 <sup>a</sup>	G0 <sup>a</sup>	G4 <sup>b</sup>

**Cuadro 4.** Diseño experimental y lesiones mostradas en escala de grados G0-G4 (Lightner 1996) en camarones *L. vannamei* en un periodo de observación de 87 hs. \* Literales diferentes indican diferencia estadística ( $p= 0.001$ ).

<b>Grupo A Controles negativos.</b>						
<b>Identificación</b>		<b>Sexo</b>	<b>Condición Corporal</b>	<b>Lesiones</b>		
				<b>Estómago</b>	<b>Branquias</b>	<b>Otros órganos</b>
<b>1</b>	<b>1</b>	H	BC	G0	G0	SCPA
	<b>2</b>	H	BC	G0	G0	SCPA
	<b>3</b>	H	BC	G0	G0	SCPA
	<b>4</b>	M	BC	G0	G0	SCPA
<b>2</b>	<b>5</b>	M	BC	G0	G0	SCPA
	<b>6</b>	M	BC	G0	G0	SCPA
	<b>7</b>	M	BC	G0	G0	SCPA
<b>3</b>	<b>8</b>	M	BC	G0	G0	SCPA
	<b>9</b>	M	BC	G0	G0	SCPA
	<b>10</b>	H	BC	G0	G0	SCPA

**Cuadro 5.** En este cuadro se puede observar que ninguno de los órganos revisados presenta cambios patológicos aparentes y que los órganos blanco (estómago y branquias) se encuentran en el G0 dentro de la clasificación de Lightner.

#### **Abreviaturas.**

**H-** Hembra, **M-** Macho, **CIIN-** Cuerpos de Inclusión Intranucleares, **HN-** hipertrofia nuclear, **BC-** Buena Condición Corporal, **RC-** Regular Condición Corporal, **Grnn-** Granuloma, **Hpt-** Hepatopáncreas, **SCPA-** Sin Cambios Patológicos Aparentes, **Nx-** Necrosis, **HCEC-** Hiperplasia Células Endoteliales Corazón.

#### **Clasificación Lightner (1996).**

**G0=** no daño en el órgano, **G1=** ≤ 25 % órgano dañado, **G2=** 25 a 50 % daño en el órgano, **G3=** 50 a 75 % daño en el órgano, **G4=** ≥ 75 % órgano dañado.

#### **Grado de lesión en otros órganos.**

Leve (+), moderado (++) , grave (+++).

Grupo B (dsRNAvp28/WSSV +)						
Identificación		Sexo	Condición Corporal	Lesiones		
				Estómago	Branquias	Otros órganos
1	1	H	BC	G0	G0	+ Nx músculo HCEC
	2	M	BC	G0	G0	SCPA
	3	H	BC	G0	G0	+ Nx músculo HCEC
	4	M	RC	G0	G0	+ Nx músculo HCEC
2	5	M	BC	G0	G0	SCPA
	6	M	BC	G0	G0	SCPA
	7	H	BC	G0	G0	SCPA
	8	M	BC	G0	G0	SCPA
3	9	H	BC	G0	G0	HCEC
	10	M	RC	G0	G0	Grn Hpt + Nx. Músculo
	11	M	BC	G0	G0	SCPA
	12	H	BC	G0	G0	HCEC

**Cuadro 6.** En esta tabla se puede observar que los órganos blancos (estómago y branquias) se encuentran en el G0 dentro de la clasificación de Lightner. Sin embargo, en algunos se puede apreciar que en otros órganos se encontraron cambios.

#### Abreviaturas.

**H-** Hembra, **M-** Macho, **CIIN-** Cuerpos de Inclusión Intranucleares, **HN-** hipertrofia nuclear, **BC-** Buena Condición Corporal, **RC-** Regular Condición Corporal, **Grrn-** Granuloma, **Hpt-** Hepatopáncreas, **SCPA-** Sin Cambios Patológicos Aparentes, **Nx-** Necrosis, **HCEC-** Hiperplasia Células Endoteliales Corazón.

#### Clasificación Lightner (1996).

**G0=** no daño en el órgano, **G1=** ≤ 25 % órgano dañado, **G2=** 25 a 50 % daño en el órgano, **G3=** 50 a 75 % daño en el órgano, **G4=** ≥ 75 % órgano dañado.

#### Grado de lesión en otros órganos.

Leve (+), moderado (++), grave (+++).

Grupo C (dsRNAorf89/WSSV+)						
Identificación		Sexo	Condición Corporal	Lesiones		
				Estómago	Branquias	Otros órganos
1	1	H	BC	G0	G0	SCPA
	2	H	BC	G0	G0	SCPA
	3	H	BC	G0	G0	SCPA
	4	H	BC	G0	G0	SCPA
2	5	M	BC	G0	G0	Grn Hpt + Nx. músculo
	6	M	BC	G0	G0	SCPA
	7	H	BC	G0	G0	SCPA
	8	M	BC	G0	G0	HCEC
3	9	H	BC	G0	G0	SCPA
	10	M	BC	G0	G0 <i>Zoothamnium</i> <i>sp.</i>	SCPA
	11	M	BC	G0	G0	SCPA
	12	H	BC	G0	G0	SCPA

**Cuadro 7.** En esta tabla se puede observar que los órganos blancos (estómago y branquias) se encuentran en el G0 dentro de la clasificación de Lightner. Sin embargo, en algunos se puede apreciar que en otros órganos se encontraron cambios.

#### Abreviaturas.

**H-** Hembra, **M-** Macho, **CIIN-** Cuerpos de Inclusión Intranucleares, **HN-** hipertrofia nuclear, **BC-** Buena Condición Corporal, **RC-** Regular Condición Corporal, **Grn-** Granuloma, **Hpt-** Hepátopancreas, **SCPA-** Sin Cambios Patológicos Aparentes, **Nx-** Necrosis, **HCEC-** Hiperplasia Células Endoteliales Corazón.

#### Clasificación Lightner (1996).

**G0=** no daño en el órgano, **G1=** ≤ 25 % órgano dañado, **G2=** 25 a 50 % daño en el órgano, **G3=** 50 a 75 % daño en el órgano, **G4=** ≥ 75 % órgano dañado.

#### Grado de lesión en otros órganos.

Leve (+), moderado (++), grave (+++).

Grupo D (dsRNA - WSSV+)						
Identificación		Sexo	Condición Corporal	Lesiones		
				Estómago	Branquias	Otros órganos
1	1	H	BC	G4 CIIN, HN	G4 CIIN, HN	++ Nx órgano linfoide y CIIN
	2	H	–	G4 CIIN, HN	G4 CIIN, HN	+++ Nx órgano linfoide y CIIN
	3	M	–	G4 CIIN, HN	G4 CIIN, HN	+++ Nx órgano linfoide y CIIN
	4	M	–	G4 CIIN, HN	G4 CIIN, HN	+++ Nx órgano linfoide y CIIN Grn Hpt
2	5	M	–	G4 CIIN, HN	G4 CIIN, HN	+++ Nx órgano linfoide y CIIN Grn Hpt + Nx. músculo
	6	M	–	G4 CIIN, HN	G4 CIIN, HN <i>Zoothamnium</i> <i>sp.</i>	+++ Nx órgano linfoide y CIIN Grn Hpt
	7	H	–	G4 CIIN, HN	G4 CIIN, HN	+++ Nx órgano linfoide y CIIN
	8	M	–	G4 CIIN, HN	G4 CIIN, HN	+++ Nx órgano linfoide y CIIN
3	9	H	BC	G4 CIIN, HN	G4 CIIN, HN	+++ Nx órgano linfoide y CIIN
	10	M	BC	G4 CIIN, HN	G4 CIIN, HN	+++ Nx órgano linfoide y CIIN
	11	M	BC	G4 CIIN, HN	G4 CIIN, HN	+++ Nx órgano linfoide y CIIN
	12	H	BC	G4 CIIN, HN	G4 CIIN, HN	+++ Nx órgano linfoide y CIIN

**Cuadro 8.** En este cuadro se puede observar que los órganos revisados presentan alteraciones morfológicas y que los órganos blanco (estómago y branquias) se encuentran en el G4 dentro de la clasificación de Lightner.

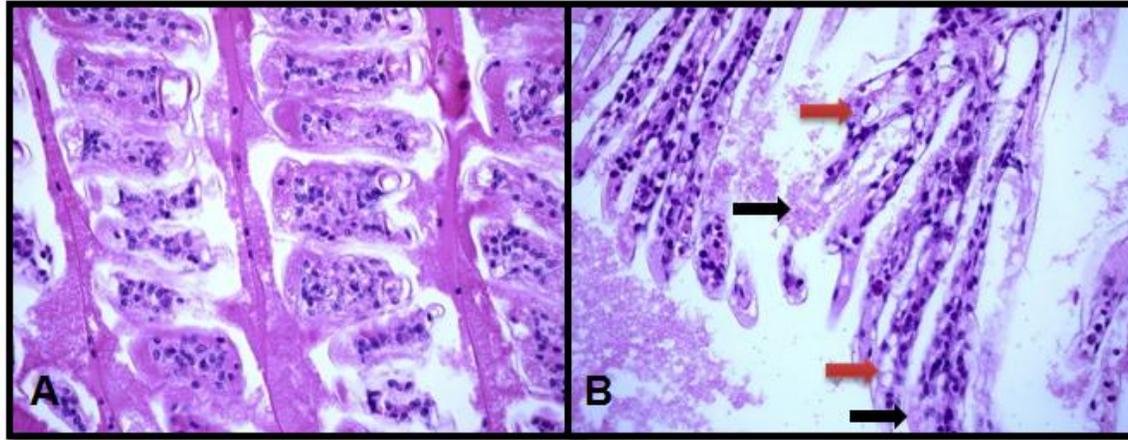
#### Abreviaturas.

**H-** Hembra, **M-** Macho, **CIIN-** Cuerpos de Inclusión Intranucleares, **HN-** hipertrofia nuclear, **BC-** Buena Condición Corporal, **RC-** Regular Condición Corporal, **Grrn-** Granuloma, **Hpt-** Hepatopáncreas, **SCPA-** Sin Cambios Patológicos Aparentes, **Nx-** Necrosis, **HCEC-** Hiperplasia Células Endoteliales Corazón.

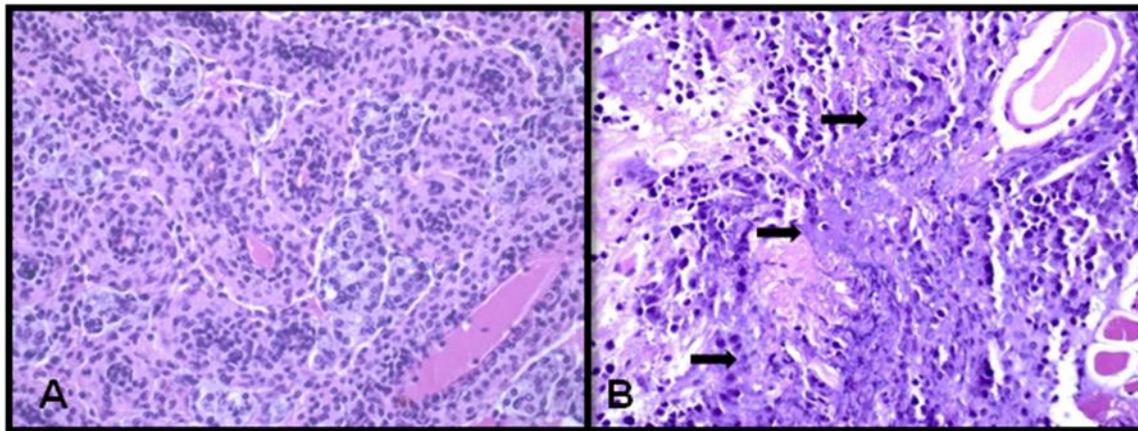
**Clasificación Lightner (1996).** **G0=** no daño en el órgano, **G1=** ≤ 25 % órgano dañado, **G2=** 25 a 50 % daño en el órgano, **G3=** 50 a 75 % daño en el órgano, **G4=** ≥ 75 % órgano dañado.

#### Grado de lesión en otros órganos.

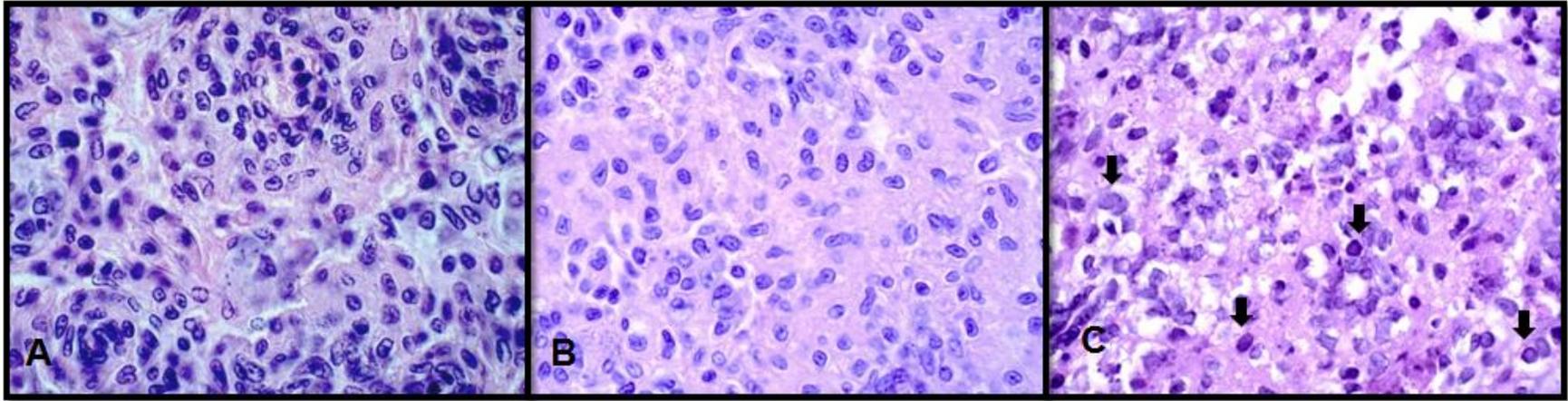
Leve (+), moderado (++) , grave+++).



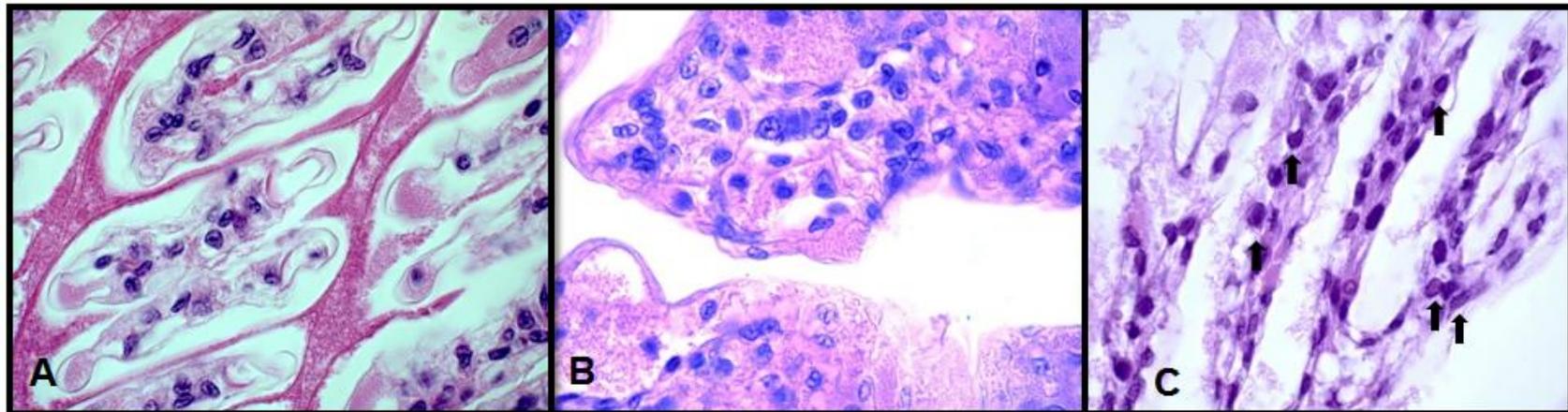
**Figura 9.** **A** Branquias de camarón tratado con dsRNA -vp28 e infectado con WSSV, las cuales no presentan cambios patológicos. **B.** Branquias de camarón no tratados con dsRNA e infectado con WSSV. Las flechas negras muestran áreas de necrosis y las flechas rojas exhiben células epiteliales con citoplasma vacuolado (degeneración). HE. 40X.



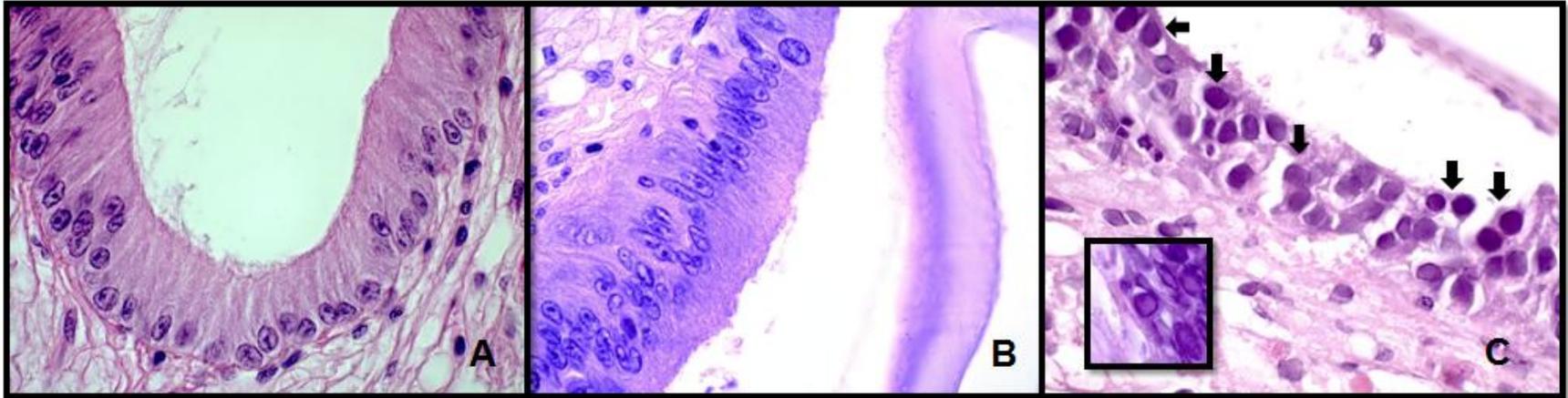
**Figura 10.** **A.** Órgano linfoide de camarón tratado con dsRNA-orf89 e infectado con WSSV, el cual no presenta cambios patológicos. **B.** Órgano linfoide de camarón no tratado con dsRNA. Las flechas negras muestran las extensas áreas con necrosis. HE 40X.



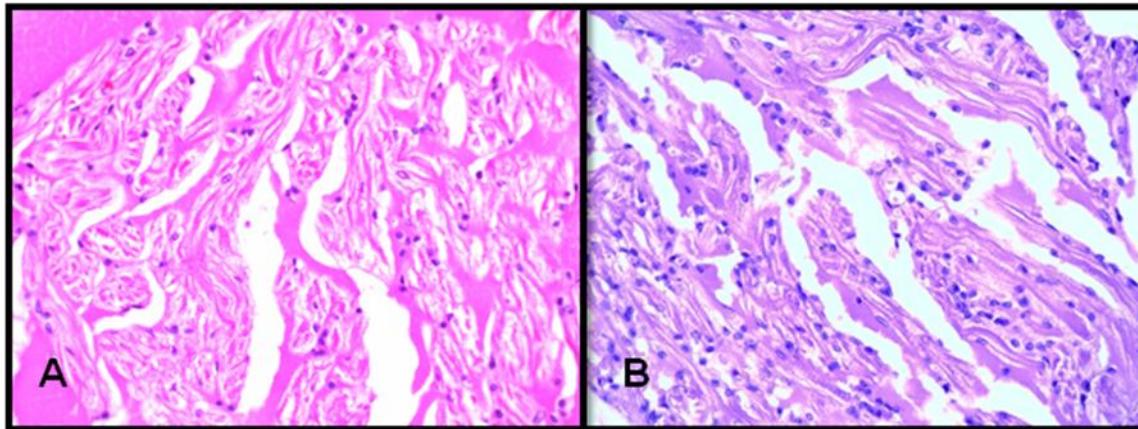
**Figura 11.** A. Órgano linfoide de camarón sin recibir ningún tratamiento (control negativo). B. Órgano linfoide de camarón tratado con dsRNA-orf89 e infectado con WSSV, sin cambios patológicos. C. Órgano linfoide de camarón no tratado con dsRNA. Las flechas negras muestran los cuerpos de inclusión intranucleares. HE (100X).



**Figura 12.** A. Branquias de camarón sin recibir ningún tratamiento (control negativo). B. Branquias de camarón tratado con dsRNA-vp28 e infectado con WSSV, sin cambios patológicos. C. Branquias de camarón no tratado con dsRNA. Las flechas negras muestran los cuerpos de inclusión intranucleares anfófilos amorfos. HE 100X.



**Figura 13.** A. Estómago de camarón sin recibir ningún tratamiento (control negativo). B. Estómago de camarón tratado con dsRNA-ORF89 e infectado con WSSV, este no presenta cambios patológicos. C. Estómago de camarón no tratado con dsRNA. Las flechas negras muestran los cuerpos de inclusión intranucleares anfófilos amorfos. El recuadro de la parte inferior izquierda muestra un acercamiento del cuerpo de inclusión intranuclear HE 100X.



**Figura 14.** A. Corazón de camarón, control negativo, sin cambios patológicos aparentes. B. Corazón de camarón tratado con dsRNA-vp28, en el cual se observa un aumento en el número de las células endoteliales (hiperplasia de células endoteliales). HE 40X.

## 8. DISCUSIÓN.

En el cultivo de camarones las enfermedades virales provocan grandes pérdidas económicas, en especial el WSSV <sup>(1, 4, 5, 6, 8, 31)</sup>. Por tal motivo se están buscando nuevas estrategias para combatirlo. El RNAi se ha propuesto como una herramienta poderosa para abatir las enfermedades virales en camarones, la cual induce el silenciamiento génico de secuencias específicas correspondientes a un gen. El dsRNA introducido dentro en la célula blanco tiene como objetivo final degradar al RNAm que presenta el 100% de complementareidad en su secuencia, inhibiendo así la síntesis de proteínas <sup>(37, 41, 42, 44, 45)</sup>. Por tal motivo se decidió utilizar esta herramienta para evaluar el grado de lesión en camarones expuestos al virus. En el presente trabajo podemos observar que a las 87hs post-inoculación existió un efecto antiviral en camarones tratados con dsRNA específico para vp28 y orf89. En ambos casos los camarones sometidos a silenciamiento génico no manifestaron signos de la enfermedad (puntos blancos en exoesqueleto <sup>(31, 32)</sup>, coloración roja por la expansión de los cromatóforos <sup>(34)</sup>, reducción en el consumo del alimento, nado lento, errático y muerte <sup>(31,35)</sup> a diferencia de los camarones que no recibieron el tratamiento con dsRNA específico, quienes manifestaron todos los signos anteriores (excepto puntos blancos en el exoesqueleto).

La eficacia del silenciamiento génico se evaluó con la técnica de PCR para secuencias específicas (vp28 y orf89), en la cual no se detectó ninguno de los genes silenciados. Esto se relaciona directamente con la manifestación de signos. En comparación con aquellos organismos que no recibieron tratamiento, se apreció la expresión de los genes de las secuencias buscadas (vp28 y orf89).

Para evaluar el efecto con otras secuencias que no se estaban silenciando, se decidió realizar la PCR de los camarones tratados con dsRNA específico contra otra secuencia que no se había silenciado en ese camarón (Camarones tratados con dsRNA-vp28 contra

secuencia orf89 y camarones tratados con dsRNA-orf89 contra secuencia vp28). Los resultados arrojados por estos enfrentamientos muestran que además de inhibir la expresión de una secuencia deseada, se tiene un efecto sobre otras secuencias no específicas, ya que al buscar la expresión de los genes no silenciados en los camarones tratados con dsRNA específico, ésta era nula o sólo en un caso se observó (dsRNA-orf89 contra vp28). Estas observaciones muestran el efecto antiviral que tiene el dsRNA, el cual se pudo observar en aquellos camarones que sobrevivieron después de 87hs post-inoculación y es comparable con los datos reportados en otros trabajos <sup>(43, 44, 45)</sup>.

Una vez evaluado el silenciamiento se revisaron los tejidos para determinar el grado de lesión provocado por el WSSV en camarones tratados con dsRNA-vp28 y dsRNA-orf89. Se buscó en los órganos blanco (branquias y hepatopáncreas) (5, 11) las lesiones típicas de la infección por WSSV (hipertrofia nuclear, cuerpos de inclusión intranucleares anfófilos amorfos y/o necrosis) <sup>(5, 11, 31, 32)</sup>, a las cuales se les asignó un grado de severidad; este se designó de acuerdo a la escala de grado de lesión de Lightner <sup>(31)</sup> que va de G0 a G4. Los camarones que recibieron tratamiento con dsRNA específico, tanto para vp28 como para orf89, se localizaron dentro del G0. Los camarones que no recibieron tratamiento con dsRNA exhibieron las lesiones características por WSSV y esto los ubicó dentro del grado G4. Estas observaciones demostraron que los camarones tratados con dsRNA específico a las 87 hs, tanto para vp28 como para ORF89, muestran diferencias significativas ( $p= 0.001$ ) por la infección de WSSV en los órganos blancos (branquias y estómago) con respecto a los camarones que no recibieron tratamiento con dsRNA. Estas conclusiones se fortalecen con las observaciones realizadas para evaluar la eficacia *in vivo* ya que los camarones tratados con dsRNA-vp28 y dsRNA-orf89 no manifestaron signos clínicos de enfermedad (excepto dos organismos sospechosos en el grupo vp28), aunado a esto que al realizar la PCR para evaluar la eficacia de la

interferencia por dsRNA, no se expresaron las secuencias silenciadas para ninguno de los tratamientos.

Es importante señalar que uno de los tejidos que presentó numerosos cuerpos de inclusión y necrosis fue el órgano linfoide, lo cual se reporta en la literatura. Esto confirma que el órgano linfoide es también un blanco para la infección por WSSV <sup>(2, 5, 6, 11, 31)</sup>, el cual es sumamente importante revisar cuando se realice el diagnóstico de WSSV mediante el estudio histopatológico, además de que la OIE lo recomienda para su diagnóstico <sup>(8)</sup>. La literatura destaca el papel importante que cumple el órgano linfoide en los mecanismos de defensa antiviral del *L. vannamei* como parte integral del sistema circulatorio y filtro de partículas virales <sup>(5)</sup>. El contribuye como un mecanismo de defensa antiviral en camarones, ya que si no existe un correcto funcionamiento del órgano linfoide esta falla puede verse reflejada en la persistencia de la enfermedad.

Macroscópicamente los camarones no tratados con dsRNA no presentaron las manchas blancas “típicas” de la enfermedad <sup>(31, 32)</sup>. Esto confirma la importancia de no tomar como diagnóstico definitivo la presencia de estas lesiones en el exoesqueleto de los camarones infectados con WSSV <sup>(11)</sup>.

El efecto antiviral del dsRNA específico se manifestó con la sobrevivencia de los camarones tratados, comprobando además que el mecanismo de RNA de interferencia por RNA es una herramienta eficiente y que juega un papel fundamental en la inmunología de los crustáceos <sup>(6)</sup>. Histológicamente, los camarones tratados con dsRNA específico no presentaron cambios patológicos aparentes en los órganos blanco, ni en el órgano linfoide. La muerte en camarones infectados por WSSV no tratados con dsRNA puede asociarse a la falla de los órganos blanco, mismos que son vitales para estos organismos <sup>(11)</sup>. Es importante destacar que algunos organismos tratados con dsRNA

exhibieron leve infiltrado por hemocitos, leve necrosis, granulomas en hepatopáncreas así como hiperplasia de células endoteliales del corazón, la cual se ha reporta en organismos que han sufrido viremia. Se puede decir que los organismos de este grupo presentaron una infección viral asociada a la inoculación del WSSV, la cual se disminuyó por el efecto del dsRNA específico.

Este es el primer estudio que determina las diferencias a nivel histopatológico en camarones *L. vannamei* sometidos a bioensayos de reto contra WSSV y tratados con dsRNA específico. También se pudo observar que la protección fue independiente de cualquiera de las secuencias silenciadas, ya que no se encontraron diferencias marcadas entre los tratamientos para vp28 y orf89 tales como la presentación de signos, mortalidad ni alteraciones histopatológicas.



## 9. CONCLUSIONES

1. Al aplicarse a los camarones una dosis de 4 µg de dsRNA específico del gen vp28 o del gen orf89 se encontró un efecto de inhibición de la replicación viral a las 87 hs post-inoculación en contra de la infección por WSSV, lo cual se relacionó con que estos animales no presentaron ninguna lesión característica de la enfermedad en las secciones revisadas. Además, la mayoría de la población de los grupos tratados con dsRNA no manifestaron signos de enfermedad ni lesiones y la homología del dsRNA hacía el RNAm, se vio reflejada en la PCR, ya que no se amplificaron las secuencias silenciadas.

2. La interferencia por el dsRNA desencadenó un efecto en los camarones sometidos con silenciamiento génico; ya que el 100 % de los camarones no tratados con dsRNA específico murieron al ser enfrentados al virus y además presentaron las lesiones características de la enfermedad. Mientras que los en los camarones tratados con dsRNA específico tanto de vp28 como de orf89, se observó una sobrevivencia del 100% a las 87 hs post-inoculación.

3. El silenciamiento génico por dsRNA es una potente herramienta contra infecciones virales, ya que los camarones tratados con dsRNA e infectados con el virus, se encontraron en el grado G0 de la escala de Lightner. Estos no presentaron las lesiones características de la infección por WSSV, a diferencia de los camarones no tratados con dsRNA que se encontraron en el grado G4, el cual es el grado mayor de esta escala en dicha clasificación, lo cual se restringió a 87 hs.

4. Concluimos que para lograr un eficiente silenciamiento génico es importante: determinar la dosis efectiva del dsRNA y del inóculo viral, determinar una vía de administración práctica y eficiente para el dsRNA y determinar la vida media del dsRNA específico dentro del organismo y sus requerimientos de inducción.

5. Al realizar el estudio histopatológico de camarones sospechosos a WSSV se deben analizar branquias, estómago e incluir al órgano linfoide para su diagnóstico.

## **10. APENDICE 1.**

### **Síntesis de la doble cadena.**

#### **1 Extracción de DNA y purificación.**

El DNA del WSSV fue obtenido a partir de branquias de un camarón infectado siguiendo el protocolo de Sambrook and Russell, (2001). Se tomó 0.1 g de tejido infectado el cual se homogenizó en 500 µl de buffer de lisis (2% Triton-x 100, 1% dodecil sulfato de sodio [SDS], 100 mM NaCl, 10 mM Tris Cl pH 8.0, 1 mM ácido etilen-diaminotetraacético [EDTA]) e incubo a 37°C por 24 hrs con proteinasa K (0.02 g/ml). Las muestras se lavaron dos veces con 500 µl en una solución de fenol-cloroformo- alcohol isoamil (25-24-1) (v/v). Se recolecto la fase acuosa y el DNA fue precipitado en una mezcla de etanol absoluto-acetato de amonio (5M) (10:1 v/v). El DNA precipitado fue lavado con etanol al 70%, secado y re-suspendido en 50 µl de agua. La calidad del DNA fue observada por electroforesis en un gel de agarosa al 8%. Este se almacenó a 4°C.

#### **2. Síntesis de dsRNA de vp28 y orf89.**

##### **2.1 Primera amplificación por PCR**

El DNA del WSSV aislado, fue usado como templado para amplificar las secuencias del WSSV vp28 y orf89 por una PCR de un paso. Los iniciadores utilizados para amplificar la secuencia vp28 y orf89 se muestran en la tabla 3. Cada producto de PCR (1µl) fue obtenido de su amplificación respectiva, además se realizó un control de doble cadena (lacZ). Las amplificaciones fueron separadas y mezcladas con 1 µl (20 ng/ µl) de TOPO linker® (1µl solución salina, 3 µl de agua esteril destilada y 1 µl Block-iT T7-TOPO linker®, Invitrogen, USA). Esta mezcla fue incubada durante 15 minutos a 37°C e inmediatamente después se almacenado a 4°C.

## **2.2 Segunda amplificación por PCR.**

Los productos de las tres reacciones del TOPO-linked fueron usados como templado para obtener el sentido y antisentido de las secuencias de DNA. Dos reacciones por separado fueron hechas con el mismo protocolo de PCR que a continuación se describe. La amplificación del sentido fue hecho con su respectivo iniciador (VP28R3 para VP28; orf89R para orf89; y R2 para LacZ) y el primer Block-iT T7 primer (Invitrogen, USA). La amplificación del antisentido fue hecha con respectivos primers (VP28F3 para VP28, orf89F para orf89; y F2 para LacZ) y el primer Block-iT T7. Los productos de PCR antisentido y sentido fueron usados para generar el transcrito de RNA del sentido y antisentido para VP28, ORF89 o LacZ, respectivamente. La calidad e integridad de cada producto de PCR fue determinado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

## **2.3 Transcripción in vitro.**

El sentido y antisentido de los productos de PCR se utilizaron para realizar la transcripción in vitro. Una mezcla (21  $\mu$ l de agua libre de RNA, 8  $\mu$ l dNTP's [75mM], 1  $\mu$ l del respectivo sentido y antisentido de DNA, 4  $\mu$ l 10X buffer de transcripción, 6  $\mu$ l Block-iT T7 enzima) fue preparado en un microtubo estéril de 1.5 ml e incubado a 37°C por 6 horas. Después de este tiempo, se le agregó a cada uno de los tubos 2  $\mu$ l de DNAsa y se dejó incubar por 15 minutos a 37 °C.

## **2.4 Purificación del transcrito y alineación.**

Al RNA transcrito resultante se le agregó 160  $\mu$ l de RNA binding buffer al con 1% (v/v) 2-mercaptoetanol, 100  $\mu$ l de etanol absoluto, este se mezcló por medio pipeteo. La mezcla se colocó en filtros de columnas (Invitrogen®, USA) y se centrifugó a 14,000 x g por 15s a temperatura ambiente. La columna fue lavada dos veces con RNA wash buffer (500  $\mu$ l) y centrifugado para remover el exceso de buffer. La columna fue transferida a un tubo de

RNA, y se le adicionó agua libre de RNA (40  $\mu$ l) y se dejó incubar por un minuto a temperatura ambiente. Inmediatamente después se centrifugo, esto se realizó en dos ocasiones; obteniendo así un volumen total de 80  $\mu$ l de cada cadena sencilla de RNA. Para construir la doble cadena, se alineó el respectivo sentido y antisentido de las cadenas simples de RNA de vp28, orf89 y LacZ. Las cadenas de dsRNA se mantuvieron almacenadas a -20°C hasta su uso, para mantener la eficiencia de estas.

### **3. Condiciones de temperatura y tiempo para las amplificaciones de:**

**vp28.** Desnaturalización 94°C por 30s, alineación 58°C por 30s, extensión 72°C por 45s por 32 ciclos y una extensión final de 72°C por 5 min.

**orf89.** Desnaturalización 95°C por 45 s, alineación 58°C por 45s, extensión 72°C por 1 min, y una extensión final de 72°C por 10 min.

**$\beta$ -actina.** Desnaturalización 94°C por 1 min, alineación 57°C por 45s, extensión 72°C por 1 min, y una extensión final de 72°C por 10 min.

### **4. Condiciones de reacción para las amplificaciones de:**

**vp28 y orf89:** H<sub>2</sub>O estéril (17.8 $\mu$ l), Buffer 10X (2.5 $\mu$ l), ClMg 50mM (1 $\mu$ l), Primer F (1 $\mu$ l), Primer R (1 $\mu$ l), dNTP's 10mM (0.5 $\mu$ l), templado de DNA (1  $\mu$ l) y *Taq* polimerasa (0.2  $\mu$ l).

**$\beta$ -actina:** H<sub>2</sub>O estéril (6.2 $\mu$ l), Buffer 10X (1.5 $\mu$ l), ClMg 50mM (0.5 $\mu$ l), Primer F (2.5 $\mu$ l), Primer R (2.5 $\mu$ l), dNTP's 10mM (1.2 $\mu$ l), templado de DNA (0.5  $\mu$ l) y *Taq* polimerasa (0.1  $\mu$ l).



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADGER W.N. Sustainability and social resilience in coastal resource use. CSERGE working paper GEC 1998; 97-23.
2. LIGHTNER, D.V. The Penaeid Shrimp Viral Pandemics due to IHHNV, WSSV, TSV and YHV: History in the Americas and Current Status. 32<sup>nd</sup> Meeting (2003) Aquaculture and Pathobiology of Crustacean and Other Species Proceedings of the thirty-second UJNR Aquaculture Panel Symposium, Davis and Santa Barbara, California, U.S.A., November 17-18 and 20 th, 2003.
3. ROSENBERRY B. World Shrimp Farming (ed. by B. Rosenberry), Shrimp News International, San Diego, USA. 2002: 3 -6.
4. SÁNCHEZ-MARTÍNEZ J.G., AGUIRRE-GUZMÁN G., MEJÍA-RUIZ H. White Spot Syndrome Virus in cultured shrimp: A review. Aquaculture Research 2007; 38:1339-1354
5. MALDONADO, M., RODRÍGUEZ, J., BLAS, I. El camarón de cultivo frente al WSSV, su principal patógeno. Ecuador. Aquatic 2004; 21: 78-91.
6. MORALES V.Q., CUÉLLAR-ANJEL. Patología e inmunología de camarones penaeidos. 1er edición. Panamá. 2008: 57-58, 70-72.
7. MONTESDEOCA M., AMANO Y., ECHEVERRIA F., BETANCOURT I., PANCHANA F., SOTOMAYOR M., RODRÍGUEZ J. La respuesta inmunitaria celular del camarón *Litopenaeus vannamei* al WSSV y su utilidad en el control de enfermedades en los estanques. El Mundo Acuícola 2002; 8: 38-42.
8. OIE 2009. [http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A\\_00049.htm](http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_00049.htm)
9. CHÁVEZ S. M. C., MONTOYA, R. L. Medidas de Bioseguridad para evitar la Introducción y Dispersión de Enfermedades Virales en Granjas Camaronícolas. In: Cruz Suarez L. E., Ricque Marie D., Nieto López M. G., Villareal D., Scholz U. y González M.,

Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional Acuícola. 16-19 noviembre, Hermosillo Sonora. México. 2004; 650-670.

10. GÓMEZ G. B., ROQUE Q., GUERRA F. A. L. Enfermedades Infecciosas más comunes en la Camaronicultura en México y el impacto del Uso de Antimicrobianos en Camaronicultura y Medio Ambiente. Federico Páez-Ozuna. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. UNAM. Mazatlán, Sinaloa, México. 2001: 332-33.

11. LEU J.-H., YANG F., ZHANG X., XU X., KOU G.-H., LO C.-F. Whispovirus. En: Etten J. V. Lesser Known Large dsDNA Viruses (Current topics in Microbiology and Immunology). Nebraska USA, Springer 2009; 328: 192-227.

12. GALAVIZ-SILVA L. MOLINA-GARZA Z. J., ALCOCER-GONZÁLEZ J.M., ROSALES-ENCINAS J.L. & IBARRA- GAMEZ C. White Spot síndrome virus genetic variants detected in Mexico by a new multiplex PCR method. Aquaculture 2004; 242: 53-68.

13. NOM-EM-003-PESC-2000 enfermedades virales de crustáceos acuáticos

14. ICVT (International Committee on Taxonomy of Viruses). [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ictv/fs\\_nimav.htm](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ictv/fs_nimav.htm)

15. VAN HULTEN M.C., WESTENBERG M., GOODALL S.D. & VLAK J.M. Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. Virology 2000a; 266: 227-236.

16. HUANG C., ZHANG X., LIN Q., XU X., HU Z. & HEW C. L. Proteomic analysis of shrimp white spot syndrome viral proteins and characterization of a novel envelope protein VP466. Molecular and Cellular Proteomics 2002; 1: 233-231.

17. VAN HULTEN M. C., REIJNS M., VERMEESCH A. M. ZANDBERGEN F. & VLAK J. M. Identification of VP19 and VP15 of White spot síndrome virus (WSSV) and

glycosylation status of the WSSV major structural proteins. The Journal of General Virology 2002; 83: 257-265

18. ESCOBEDO-BONILLA C. M., ALDAY-SANZ V., WILLE, M., SORGELOOS P., PENSAERT, M., M., NAUWYNCK, H., J. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. Journal of Fish Diseases 2008; 31: 1-18.

19. WITTEVELDT J. VAN HULTEN M.C. & VLAK J.M. Identification and phylogeny of non-specific endonuclease gene of white spot syndrome virus of shrimp. Virus Genes 2001; 26: 331-337.

20. Chen L.L., *et al.* Transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of shrimp white spot syndrome virus. Virology 2002; 301: 136-174.

21. YI G.H., WANG Z.M., QIY.P., YAO L.G., QIAN J. & HU L.B. Vp28 of shrimp white spot syndrome virus is involved in the attachment and penetration into shrimp cells. Journal of Biochemistry and Molecular Biology 2004; 37: 726-734.

22. VAN HULTEN M.C., GOLDBACH R.W. & VLAK J.M. Three functionally diverged major structural proteins of white spot syndrome virus evolved by gene duplication. The Journal of General Virology 2000b; 81: 2525-2529.

23. VAN HULTEN M.C., WITTEVELDT J., SNIPPE M. & VLAK J.M. White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. Virology 2001; 285: 228-233.

24. XIE X. & YANG F. Interaction of white spot syndrome virus VP26 protein with actin. Virology 2005; 336: 93-99.

25. LIU X. & YANG F. Identification and function of a shrimp white spot syndrome virus (WSSV) gene that encodes a dUTPase. Virus Research 2005; 110: 21-30.

26. WANG Z.M., HU L.B., YI G.H., XU H., QIY.P. & YAO L.A. ORF390 of white spot syndrome virus genome is identified as a novel anti-apoptosis gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004; 325: 899-907.
27. FLINT S.J., ENQUIST L.W., KRUG R.M., RACANIELLO V.L. & SKALKA A.M. *Principles in Virology*. ASM Press, Washington DC, USA. 2000.
28. KHADIJAH S., NEO S.Y., HOSSAIN M.S., MILLER L.D., MATHAVAN S. & KWANG J. Identification of white spot syndrome virus latency-related genes in specific-pathogen-free shrimps by use of a microarray. *Journal of Virology* 2003; 77: 10162-10167.
29. LIUW.J., CHANGY.S., WANG C.H., KOU G.H. & LO C.F. Microarray and RT-PCR screening for white spot syndrome virus immediate-early genes in cycloheximide-treated shrimp. *Virology* 2005; 334: 327-341.
30. WENLIN W., LEI W., XIAOBO Z. Identification of white spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection. *Virology* 2005; 332: 578-583.
31. LIGTHNER D.V. *A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. USA. 1996.
32. WANG C.H., *et al.* Purification and genomic analysis of baculovirus associated white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 1995; 23: 239-242.
33. ALDAY G. V. Diagnóstico y prevención de la enfermedad del punto blanco. Ecuador. *El mundo acuícola*. 1999; 1: 3-6.
34. INOUE K., *et al.* The penaeid rod-shape DNA virus (PRDV) which causes penaeid acute viremia (PAV). *Fish Pathology* 1996; 31; 39-45.
35. CHANG P.S., LO C.F., WANG Y. C. & KOU G.H. Identification of white spot syndrome associated baculovirus WSBV target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. *Diseases of Aquatic Organisms* 1996; 7: 131-139.

36. ABBAS A. K., LICHTMAN A. H., POBER J. S. Inmunología celular y molecular. España, Mc Graw Hill 2002 4ta edición. pp 4,5.
37. López T., Silva D., López S., Arias C. RNA de interferencia: el silencio de los genes. Biotecnología 2007; 14: 109-118.
38. Wasi Safia. RNA interference: the next genetics revolution? Nature. 2003 May.
39. The Nobel Assembly at Karolinska Institutet. Advanced Information in The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006. Nobelförsamlingen. <http://nobelprize.org>
40. HERNÁNDEZ GARCÍA J. L. ARN de interferencia y su importancia en la biomédica molecular. Bioquímica. 2005; 30: 004. pp. 118-127.
41. SARATHI M., SIMON M. C., VENKATESAN & HAMEED A. S. S. Oral administration of Bacterially expressed VP28dsRNA to protect *Panaeus monodon* from White Spot Syndrome Virus. Mar Biotechnol 2007.
42. KIM C. S., KOSUKE Z., NAM Y. K., KIM S. K., KIM K. H. Protection of shrimp (*Penaeus chinensis*) against white spot syndrome virus (WSSV) challenge by double-stranded RNA. Fish & Shellfish Immunology 2007; 23: 242-246.
43. MEJÍA-RUIZ C. H., VEGA-PEÑA S., ESCOBEDO-BONILLA C. M. Comparison of protection by double-stranded RNA against white spot syndrome virus (WSSV) vp28 or vp26 upon consecutive WSSV re-challenges. En revision 2008.
44. ROBALINO J., *et al.* Double-Stranded RNA induces Sequence-Specific Antiviral Silencing in Addition to Nonospecific Immunity in a Marine Shrimp: Covergence of RNA Inteferencie and Innate Immunity in the Invertebrate Antiviral Response? Journal of virology. 2005; 79. 21: 13561-13571.

45. Xu J., Han., Zhang X., Silencing shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes by siRNA. *Antiviral research.* 2007, 73: 126-13.