



UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS**

POSGRADO EN BIOCENCIAS

**SILENCIAMIENTO DE LA ADN POLIMERASA
DEL HERPESVIRUS DE OSTREIDOS 1 (OsHV-1)
EN EL OSTIÓN DEL PACÍFICO
*Crassostrea gigas.***

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRA EN BIOCENCIAS

presenta:

CAROLINA GALLARDO YBARRA

Hermosillo, Sonora, México

17 de diciembre de 2019

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



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



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

DERECHOS DE AUTOR

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Maestro en Biociencias** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca de Ciencias Biológicas y de la Salud para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Coordinador del Programa del Posgrado.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente

Carolina Gallardo Ybarra

Autor

Dra. Nohemí Gámez Meza

Coordinadora del Programa de Maestría en Biociencias

SILENCIAMIENTO DE LA ADN POLIMERASA DEL HERPESVIRUS DE OSTREIDOS 1
(OSHV-1) EN EL OSTIÓN DEL PACÍFICO *CRASSOSTREA GIGAS*

que para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

presenta:

CAROLINA GALLARDO YBARRA

APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis intitulada “Silenciamiento de la ADN polimerasa del herpesvirus de ostreidos 1 (OsHV-1) en el ostión del pacífico *Crassostrea gigas*” presentada por Carolina Gallardo Ybarra, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Biociencias con opción en Biociencias Moleculares.

Dr. Enrique De La Re Vega



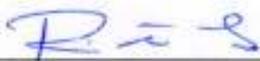
Director y presidente

Dr. José Manuel Grijalva Chon



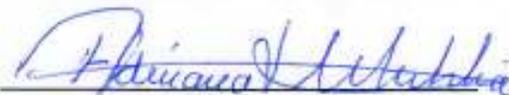
Sinodal interno y secretario

Dra. Reina Castro Longoria



Sinodal interno

Dra. Adriana Muhlia Almazán



Sinodal externo

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mi hijo Esteban, gracias por llegar a mi vida y hacerla más bonita.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por todo.

A la Universidad de Sonora y al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora por permitir llevar a cabo mi carrera profesional y mi maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo brindado durante mi posgrado.

Al Posgrado en Biociencias, por darme las herramientas y conocimiento durante la maestría.

A mi director de tesis, el Dr. Enrique De La Re Vega, gracias por darme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto y de confiar en mí, gracias por las enseñanzas y su paciencia, lo aprecio mucho.

A mi comité: Dr. Enrique De La Re Vega, Dr. José Manuel Grijalva Chon, Dra. Reina Castro Longoria y Dra. Adriana Muhlia Almazán, gracias por su tiempo, consejos y revisiones.

Al Dr. Alonso de Químico Biólogo y a Morado por su gran apoyo en la obtención del ADN plasmídico.

Al Dr. Christian Minjarez y a Adriana Gallardo gracias por su ayuda en el proceso histológico de las muestras.

Al Dr. Arturo Sánchez Paz y a Trini del CIBNOR, por su gran apoyo en el laboratorio.

Al Técnico Ariel Cruz Villacorta, por su ayuda y amistad durante la estancia de investigación en el CIBNOR La Paz.

A mis padres Adrián Gallardo Rangel y Silvia Ybarra Félix, y a todos mis hermanos, los quiero mucho.

A mis amigos de laboratorio: Mafer, Christian, Martita, Costich, Martin, Lalo, Román, Luis, Gaby, Alex, Ronchitas y Felipe, gracias por sus consejos, ayuda y por la amistad que me han otorgado, los quiero chavos.

A mis compañeros de la maestría, gracias por todos los buenos momentos, los quiero.

Y por último a mi esposo Carlos, gracias por tu apoyo en todo y estar conmigo en todo momento, te amo.

RESUMEN

La producción del ostión Pacífico *Crassostrea gigas* ha sufrido pérdidas considerables en los últimos años, debido a mortalidades causadas por la infección con el Herpesvirus de Ostreidos 1 (OsHV-1). El ARN de interferencia (ARNi) es una técnica molecular que ha demostrado ser una alternativa contra las infecciones virales. Dentro de los ARNi, están los small hairpin ARN u horquillas de ARN (shRNA), que ligados a vectores de expresión, permiten un efecto de silenciamiento de genes más prolongado. Por otro lado, las ADN polimerasas son las enzimas encargadas de la replicación del ADN viral en este caso, resultando ser un blanco ideal para el silenciamiento del gen y el control de la infección por OsHV-1. Hasta donde conocemos, no hay estudios realizados sobre el silenciamiento de la ADN polimerasa del Herpesvirus de ostreidos 1 en *C. Gigas*; por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue silenciar *in vivo* el gen de la ADN polimerasa del OsHV-1 en *C. gigas* utilizando un shRNA. La metodología consistió en la síntesis y purificación de un shRNA específico dirigido a la ADN polimerasa viral, el cual se inyectó en juveniles de *C. gigas* infectados con el OsHV-1 y se tomaron muestras a las 0, 12, 48, 72, 108 y 156 horas post infección (hpi). El silenciamiento de la ADN polimerasa viral disminuyó la mortalidad en ostiones infectados e inyectados con el shRNA. Mediante qPCR se detectó una disminución del número de copias virales a las últimas horas de infección (48, 72 y 108) para el tratamiento de organismos infectados + shRNA. Mediante la técnica de tinción hematoxilina-eosina se observaron daños severos en las branquias de los organismos infectados y por el ensayo de túnel se obtuvo un decremento de las células hemocitarias con apoptosis a las 72 hpi (19%) en las branquias de organismos infectados + shRNA, comparado con las 72 hpi (31%) de organismos infectados. También por PCR en tiempo real se detectó una disminución del número de copias virales a las 72 y 108 hpi en el tratamiento de organismos infectados e inyectados con shRNA, comparado con el tratamiento de ostiones infectados. Este es el primer reporte de silenciamiento utilizando shRNA clonado en un vector de expresión dirigido a la ADN polimerasa del OsHV-1. Los resultados sugieren que el gen de la ADN polimerasa se silenció, disminuyendo la replicación del ADN viral; lo anterior sugiere que esta podría ser una estrategia prometedora para el control de la infección en el ostión del pacífico.

ABSTRACT

The production of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* has suffered considerable losses in recent years, due to mortalities caused by infection with Oyster Herpesvirus 1 (OsHV-1). Interference RNA (RNAi) is a molecular technique that has proven to be an alternative against viral infections. Within RNAi, there are small hairpin RNAs or RNA hairpins (shRNA), which, linked to expression vectors, allow a longer gene silencing. On the other hand, DNA polymerases are enzymes that replicate DNA, proving to be an ideal target for silencing OsHV-1 and control of OsHV-1 infection. Until now, there are no investigations on silencing of DNA polymerase during infection of ostreid Herpesvirus 1 in *C. gigas*, this is why the aim of the present study is to describe *in vivo* silencing of the viral DNA polymerase gene of the OsHV-1, using a shRNA. The methodology consisted of the synthesis and purification of a specific shRNA directed to the viral DNA polymerase, which was injected into juveniles of *C. gigas* infected with OsHV-1, samples were taken at 0, 12, 48, 72, 108 and 156 hours post infection (hpi). The silencing of DNA polymerase decreased mortality in oysters infected and injected with shRNA. The haematoxylin-eosin staining technique showed severe damage to the gills of infected organisms and a decrease in hemocytic cells with apoptosis was obtained by the tunnel test at 72 hpi (19%) was observed in gills of infected organisms + shRNA, compared to the 72 hpi (31%) of the infected organisms. Also, by qPCR for the treatment of infected and injected organisms a decrease in the number of viral copies was detected at 72 and 108 hpi, compared to treating infected oysters. The results suggest that the DNA polymerase gene was silenced, preventing viral DNA replication. Therefore, it would be a promising strategy for the control of infection in the Pacific oyster.

ÍNDICE GENERAL

	Página
APROBACIÓN	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	x
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	3
I.1. La acuicultura	3
I.1.2. El cultivo del ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i>	4
I.2. La biología de <i>Crassostrea gigas</i>	4
I.3. Agentes patógenos de <i>C. gigas</i>	6
I.3.1. El Herpesvirus de Ostreidos 1	8
I.3.2. El ciclo viral de OsHV-1	10
I.4. Las ADN Polimerasas	12
I.5. El silenciamiento de genes	14
I.5.1. El ARN de interferencia	15
I.5.2. El shRNA	18
II. HIPOTESIS	20
III. OBJETIVOS	21
III.1. Objetivo general	21
III.2. Objetivos particulares	21
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	22
IV.1. Diseño y obtención del shRNA dirigido al gen que codifica a la ADN polimerasa del OsHV-1	22
IV.2. Obtención de inóculo viral de <i>OsHV-1</i>	23
IV.3. Bioensayo: Infección de <i>Crassostrea gigas</i> con el <i>OsHV-1</i> y la interferencia con el shRNA dirigido a la proteína ADN polimerasa del <i>OsHV-1</i>	24
IV.4. Extracción de ADN genómico	25
IV.5. Curvas estándar para PCR en tiempo Real (qPCR)	25
IV.6. Confirmación del silenciamiento por PCR de tiempo real	26
IV.7. Análisis estadístico	26

IV.8. Análisis histológico: ensayo de Tunel y tinción Hematoxilina Eosina	27
V. RESULTADOS	31
V. 1. Obtención de constructo vector shRNA	31
V.2. Verificación del OsHV-1 en ostiones sanos	32
V.3. Seguimiento de mortalidades	33
V.4. Verificación del OsHV-1 en organismos de los diferentes tratamientos	34
V. 5. Confirmación del silenciamiento por PCR en tiempo real	35
V. 6. Análisis de túnel	39
V. 6. Tinción hematoxilina- eosina	46
VI. DISCUSIÓN	50
VII. CONCLUSIONES	55
VIII. RECOMENDACIONES	56
IX. LITERATURA CITADA	57

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Morfología externa del ostión del Pacífico. Tomada de FAO (2016).	5
2	Anatomía interna de <i>Crassostrea gigas</i> .	6
3	Morfología de Herpesvirus de ostreidos tipo 1.	8
4	Esquema representando los diferentes pasos de la infección viral de OsHV-1.	10
5	Ciclo de vida de OsHV-1 en <i>Crassostrea gigas</i> .	12
6	Mecanismo de RNAi.	17
7	Colonias de bacterias E. coli Top 10 transformadas con el constructo vector-shRNA.	31
8	Electroforesis en Agarosa al 1.5% del ADN plasmídico purificado y los productos de PCR.	32
9	Diagnóstico para el OsHV-1 realizado a muestras de hemolinfa de ostiones utilizados en el experimental de infección, procedentes de La Cruz en Bahía de Kino, Sonora.	33
10	Gráfica de la supervivencia de los organismos en los diferentes tratamientos durante el bioensayo.	34
11	Electroforesis en Agarosa al 1.5% del ADN genómico del tratamiento de organismos infectados con OsHV-1 + shRNA.	35
12	Electroforesis en Agarosa al 1.5% del ADN genómico del tratamiento de organismos infectados con OsHV-1.	35
13	Curva estándar para ADNpol para determinar carga viral del inóculo y muestras del experimental	37
14	Gráfica de la expresión absoluta del gen ADNpol en branquias de <i>C. gigas</i> durante el experimento.	38
15	Ensayo de tunel del tejido de branquias de <i>C. gigas</i> .	39
16	Ensayo de tunel del tejido de branquias de <i>C. gigas</i> a las 12 horas post infección.	40
17	Ensayo de tunel del tejido de branquias de <i>C. gigas</i> a las 24 horas post infección.	41
18	Ensayo de tunel del tejido de branquias de <i>C. gigas</i> a las 48 horas post infección.	42

19	Ensayo de tunel del tejido de branquias de <i>C. gigas</i> a las 72 horas post infección.	43
20	Ensayo de tunel del tejido de branquias de <i>C. gigas</i> a las 108 horas post infección.	44
21	Ensayo de tunel del tejido de branquias de <i>C. gigas</i> a las 156 horas post infección. 1	45
22	Porcentaje de tejido apoptótico en branquias de <i>C. gigas</i> a las diferentes horas post infección.	46
23	Cortes histológicos de las branquias de <i>C. gigas</i> (5 μm), mediante la técnica de Hematoxilina-Eosina. a) <i>C. gigas</i> inoculados con solución salina isotónica. b) <i>C. gigas</i> inyectados con shARN. (escala = 200 μm).	47
24	Cortes histológicos de las branquias de <i>C. gigas</i> (5 μm), mediante la técnica de Hematoxilina-Eosina de las diferentes horas post infección de Herpesvirus de Ostreidos 1 e inoculados con shRNA.	48
25	Cortes histológicos de las branquias de <i>C. gigas</i> (5 μm), mediante la técnica de Hematoxilina-Eosina de las diferentes horas post infección de Herpesvirus de Ostreidos 1.	49

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Taxonomía de <i>Crassostrea gigas</i> .	5
2	Deshidratación de tejidos con etanol a diferentes concentraciones y tinción de tejidos mediante la técnica de Hematoxilina-Eosina (Lightner, 1996).	28
3	Desparafinación e hidratación de laminillas para técnica de túnel.	29

INTRODUCCIÓN

El cultivo de moluscos a nivel mundial ha tomado gran importancia debido al incremento de su producción con 17.13 millones de toneladas en el año 2016, posicionándose en el segundo lugar después del cultivo de peces. Dentro de los moluscos están los bivalvos, cuyo cultivo en México se realiza casi exclusivamente en las costas del Golfo de California, ocupando los primeros lugares de producción de América Latina (Maeda-Martínez, 2008). En la región noroeste de México, el cultivo de moluscos bivalvos se basa principalmente en el ostión japonés, *Crassostrea gigas* (Chávez-Villalba, 2014).

El desarrollo del cultivo de ostión japonés, así como el de otras especies de ostreidos se ha visto afectado por la ocurrencia de mortalidades masivas, algunas de las cuales se han asociado con parásitos, virus, bacterias y/o condiciones ambientales (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013). Infecciones virales provocadas por Herpesvirus de Ostreidos tipo 1 (por sus siglas en inglés, OsHV-1), han causado altas mortalidades en semilla y ostiones juveniles de *C. gigas*, en diferentes regiones del mundo como Japón, Nueva Zelanda, EUA, Francia y México entre otros (Renault y Novoa, 2004; Martenot *et al.*, 2011).

El OsHV-1 es un virus clasificado en la familia Malacoherpesviridae, las partículas virales muestran una morfología icosaédrica con un diámetro de 120 nm (Arzul, 2001). El ciclo de vida de este virus es directo de huésped a huésped y la infección está asociada a lesiones en juveniles, con daño en tejido conectivo de todos los órganos (OIE, 2012). El genoma del OsHV-1 es de ADN con 136 marcos de lectura, en donde el marco de lectura 100 codifica para una ADN polimerasa (Davison *et al.*, 2005).

Las ADN polimerasas son enzimas que participan en el proceso de replicación del ADN, donde se produce una copia idéntica de una doble hélice de ADN, siempre en sentido 5' a 3' (Müller-Esterl, 2008). Estas proteínas están involucradas en la replicación viral por lo que son blanco para tratamientos antivirales como los análogos nucleosídicos que funcionan como terminadores de la replicación del ADN de virus como el del herpes simplex (HVS) (Lorenzo, *et al.*, 2009; Vargas-Cordova, 2016). Actualmente se estudian tratamientos antivirales donde suprimen la replicación viral mediante el silenciamiento de genes (Dykxhoorn, *et al.*, 2006).

El silenciamiento de genes mediante ARNi es un mecanismo de silenciamiento post-transcripcional que fue descrito como una respuesta innata de las plantas a una infección viral (Dykxhoorn *et al.*, 2003; Lambeth y Smith, 2013). En este proceso intervienen diferentes enzimas las cuales degradan el ARNm y previene la traducción de las proteínas (Zamore, 2001; Dykxhoorn *et al.*, 2003; Dykxhoorn y Lieberman, 2005; Aigner, 2006). Las moléculas formadas por la degradación enzimática se denominan ARN interferentes pequeños (siARN) y se ha demostrado que son las mediadoras del proceso de interferencia (López *et al.*, 2007).

El ARNi ha sido utilizado para manipular la expresión de genes y señales, apagar genes específicos para evaluar sus roles fisiológicos o el control de la infección de un patógeno (Gitlin *et al.*, 2002). Se ha mostrado en estudios recientes que el ARNi puede ser implementado para silenciar la expresión de genes virales en células de insectos, plantas, algunos mamíferos e invertebrados (Xie *et al.*, 2005). Los resultados arrojan la posibilidad de utilizar ARNi como una herramienta antiviral para la prevención y control de enfermedades de diversas especies de cultivo, tal es el caso del silenciamiento de los genes implicados en la replicación del virus de la mancha blanca (WSSV) en *Litopenaeus vannamei*, con una reducción de la infección y aumento en la supervivencia (Wu *et al.*, 2007).

Debido a que el OsHV-1 causa pérdidas económicas importantes para la industria acuícola, es necesario el desarrollo de estrategias para combatir la dispersión del patógeno y evitar pérdidas cuantiosas en los sistemas de cultivo. La interferencia del ARN mensajero es una herramienta que ha demostrado reducir las infecciones virales, pero a la fecha hay pocos estudios sobre silenciamiento en moluscos bivalvos, por lo que esta investigación propone esta técnica para evaluar el efecto del ARNi en el gen de la ADN polimerasa viral para disminuir la replicación del OsHV-1 en el ostión japonés *C. gigas*. Así, la pregunta científica que aborda el presente estudio es: ¿Es posible reducir la infección viral del camarón mediante el silenciamiento del gen de la ADN polimerasa del Herpes virus de Ostreidos 1 utilizando un shRNA?

I. ANTECEDENTES

I.1 La acuicultura

La acuicultura es el conjunto de métodos que tienen como finalidad la producción de animales y plantas acuáticas para consumo humano, dichas técnicas controlan total o parcialmente las características del medio en el que viven los organismos. Como muchas prácticas productivas, la acuicultura puede ser llevada a cabo con técnicas más tecnológicas o sofisticadas, conocida como acuicultura de tipo intensivo, donde se controla completamente y se cierran los ciclos de producción, alimentación y el medio en el que viven los organismos. También hay de tipo más artesanal o prácticas más simples conocido como cultivo extensivo (FAO, 2016).

El cultivo de organismos acuáticos ha tomado un lugar importante para la obtención de alimentos de gran aporte proteico. De esta actividad se obtienen grandes cantidades de divisas, abasteciendo de alimentos de bajo costo y también de alto costo. Por otra parte, la acuicultura ayuda en el repoblamiento de especies en peligro. La acuicultura juega un papel muy importante, ya que ha demostrado ser de las actividades con mayor crecimiento, así que para el año 2014 la producción por acuicultura alcanzó las 73.8 millones de toneladas, mientras que la captura aportó 93.4 millones de toneladas; agregando las plantas acuáticas, se obtiene un total de producción por acuicultura de más de 100 millones de toneladas, con un valor estimado de 160.2 millones de dólares (USD) (FAO, 2016).

De la producción total, el 21.8% correspondieron al grupo de los moluscos, siendo el mayor productor de moluscos China, destacando sus cultivos de ostras perleras de agua dulce. Los moluscos bivalvos son organismos que se han cultivado durante siglos y gracias a los recientes avances tecnológicos en el campo del cultivo de moluscos se ha logrado incrementar la producción de forma significativa, llegando a tomar un lugar importante en la producción pesquera mundial (Helm *et al.*, 2006). Esta producción se ha incrementado en los últimos 50 años de casi 1 millón de toneladas en 1950 a cerca de 13.3 millones de toneladas en 2013 (FAO, 2015). Mientras que la producción de ostreidos a nivel mundial representó el

31% de la producción total de moluscos en el año 2012, que fue de 4.7 millones de toneladas (FAO, 2014; FAO, 2015).

I.1.1. El cultivo del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*

La producción del ostión japonés, también conocido como ostión del pacífico, se considera una de las más importantes en el mundo ya que es de las producciones que en 2003 se expandió más que cualquier otra especie ya sea pez, molusco o crustáceo (FAO, 2005, 2014). Los valores más recientes de producción indican para el 2012, volúmenes cercanos a las 36,000 toneladas por captura y 608,688 toneladas por acuicultura, siendo China, Corea, Japón, Francia, Estados Unidos y Taiwán los principales países productores (FAO, 2005; FAO, 2014; Chávez-Villalba, 2014).

La producción de *C. gigas* en México se lleva a cabo principalmente en la costa del Pacífico en los estados de Baja California, Baja California Sur y Sonora. Además, el cultivo de la especie se ha venido desarrollando de manera importante en Sinaloa y se tienen registros de actividad en Jalisco, Guerrero y Nayarit. La producción máxima para el litoral del Pacífico fue de 2,858 toneladas en el 2010, en donde los principales estados productores tuvieron un incremento, ocupando Sonora el tercer lugar con 116 toneladas de producción (Chávez-Villalba, 2014).

I.2. La biología de *Crassostrea gigas*

El ostión japonés pertenece al orden Ostreoida y a la familia Ostreidae (Rafinesque, 1815). La taxonomía de *C. gigas* se puede observar en la Tabla 1; esta especie tiene una concha sólida, inequivalva, rugosa, aflautada y laminada; la valva inferior es profundamente cóncava mientras que la valva superior es plana o ligeramente convexa; los lados son desiguales, con picos y umbo protuberantes e irregulares (Figura 1). La forma de la concha varía con el medio ambiente. El color suele ser blanquecino con estrías moradas y puntos que radian del umbo (FAO, 2016). Anatómicamente, el ostión japonés presenta un sólo músculo, aparato digestivo, sistema circulatorio, sistema nervioso, branquias y aparato reproductor (Figura 2; Park *et al.*, 1998).

Tabla 1. Taxonomía de *Crassostrea gigas*. Tomado de Tovar Hernández *et al.* (2012).

<i>Phylum</i>	Mollusca (Linnaeus, 1758)
Clase	Bivalvia (Linnaeus, 1758)
Orden	Ostreoida (Férussac, 1822)
Familia	Ostreidae (Rafinesque, 1815)
Género	<i>Crassostrea</i> (Sacco, 1897)
Especie	<i>gigas</i>

El ostión japonés es una especie estuarina, pero se encuentra también en puertos y bahías de aguas tropicales y templadas. Se fija en sustratos firmes en zonas protegidas y forma estructuras arrecifales en zonas intermareales, en donde lleva una vida sedentaria. Se pueden encontrar desde la zona intermareal hasta profundidades de 40 m, es raro encontrarlos en fondos arenosos y lodosos (Tovar-Hernández *et al.*, 2012). El rango de salinidad óptimo de esta especie es entre 20 y 25‰, aunque también puede existir a menos de 10‰ y puede sobrevivir en salinidades superiores a 35‰. Asimismo, es altamente tolerante a un amplio rango de temperatura que van desde -1.8 a 35 °C (FAO, 2016).

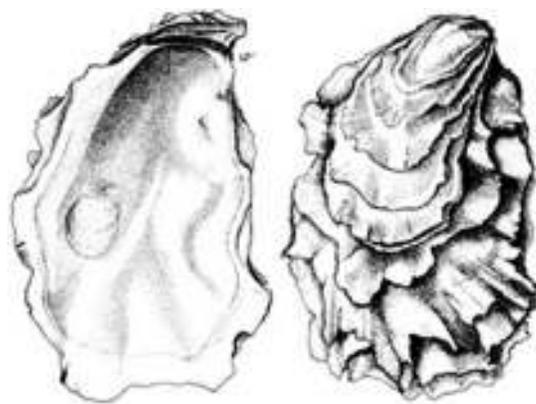


Figura 1. Morfología externa del ostión del Pacífico. Tomada de FAO (2016).

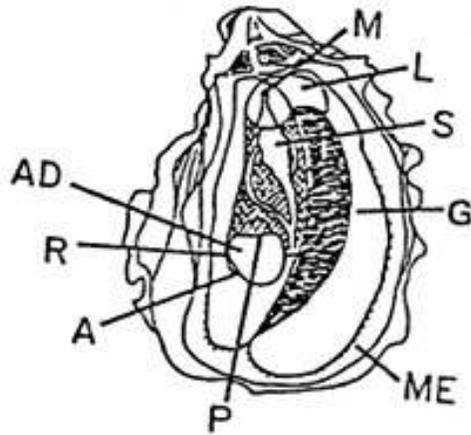


Figura 2. Anatomía interna del ostión *Crassostrea gigas*. A, ano; AD, músculo abductor; G, branquias; L, palpos labiales; M, boca; ME, manto; P, pericardio; R, recto; S, estómago. Tomado de Park *et al.* (1998).

El ostión japonés tiene un rápido crecimiento y una gran tolerancia a diversas condiciones ambientales, por lo cual ha sido elegido para su cultivo en diversas regiones del mundo. Es una especie originaria de Japón, en donde se le ha cultivado durante siglos y ha sido introducido en el resto del mundo. Hay registros desde Japón, Corea, Siberia, Australia, Estados Unidos y Canadá, en Europa desde las Islas Británicas a Portugal y en el Mediterráneo. Mientras que en América fue introducida en la parte Norte, desde el sureste de Alaska hasta Baja California. (FAO, 2016). La introducción de ostión japonés en diversos países ha obedecido al reemplazo de poblaciones nativas de ostión seriamente diezmadas ya sea por sobre-explotación o por enfermedades o simplemente para crear una nueva industria acuícola (Nehring, 2011).

El ostión japonés es hermafrodita protándrico, comúnmente madura primero como macho (FAO, 2016). Las condiciones ambientales pueden afectar su sexo ya que cuando los suministros de alimento son abundantes, los machos tienden a cambiar el sexo para convertirse a hembras y viceversa cuando la comida escasea (Nehring, 2011).

I.3. Agentes patógenos en *C. gigas*

A lo largo de los años, los sistemas de cultivo de ostión japonés han documentado episodios de mortandad, con reducciones significativas en la producción en Japón, Europa y Norteamérica. Aunque las mortalidades se dan de manera natural, las prácticas de cultivo incrementan la posibilidad de ocurrencia, ya que se cultivan densas poblaciones en áreas pequeñas y se transfieren libremente lotes de organismos sin certificación sanitaria, promoviendo la introducción y diseminación de patógenos (Chávez-Villalba, 2014). Algunos de los principales episodios de mortalidades en los cultivos de *C. gigas* registrados a lo largo de la historia han sido causados por agentes infecciosos como virus, bacterias, hongos, protozoos y metazoos; así como condiciones ambientales particularmente adversas (Vigneron *et al.*, 2004).

Dentro de las enfermedades y patógenos que afectan a los moluscos, la OIE (2015) identifica nueve patógenos notificables que producen enfermedades como: Bonamiosis (*Bonamia ostreae* y *Bonamia exitiosa*); Marteiliosis (*Marteilia refringens*), Perkinsosis (*Perkinsus marinus* y *Perkinsus olseni*), Síndrome de marchitamiento (*Xenohaliotis californiensis*), Ganglioneuritis viral del abulón (Herpesvirus del abulón), Microcitosis (*Mikrocyto smackini*) y Herpesvirus de ostreidos 1 (OsHV-1) μ var.

En el Pacífico de México, hoy en día existen estudios en los cuales se ha logrado identificar una serie de patógenos para este ostión y otros bivalvos, tales como el protozoario *Perkinsus marinus* (Cáceres-Martínez *et al.*, 2008; Enríquez-Espinoza *et al.*, 2010; Cáceres-Martínez *et al.*, 2012; Villanueva-Fonseca y Escobedo-Bonilla, 2014; Enríquez-Espinoza *et al.*, 2015; Escobedo-Fregoso *et al.*, 2013; Góngora-Gómez *et al.*, 2016; Martínez-García *et al.*, 2017), el herpesvirus de ostreidos 1 (Vásquez-Yeomans *et al.*, 2004; Vásquez-Yeomans *et al.*, 2010; Grijalva-Chon *et al.*, 2013; Martínez-García *et al.*, 2017; De La Re-Vega *et al.*, 2017) y *Marteilia refringens* (Grijalva-Chon *et al.*, 2015; Martínez-García *et al.*, 2017). Estos infectan no sólo a *C. gigas* sino también a la ostra europea *Ostrea edulis*, la ostra chilena *Tiostrea chilensis*, entre otras (Renault y Novoa, 2004; Davison *et al.*, 2005).

I.3.1. El Herpesvirus de Ostreidos 1

El Herpesvirus de ostreidos (OsHV-1) es un virus de ADN de doble cadena, clasificado en el orden Herpesvirales, en la familia Malacoherpesviridae, dentro del género Ostreavirus (Davison *et al.*, 2009). Mediante purificación y microscopía electrónica, se observó que el virus tiene una envoltura icosaohédrica con un núcleo electrodenso y un diámetro de aproximadamente 120 nm. La cápside consiste en 162 capsómeros, las glicoproteínas complejas están embebidas en la cubierta lipídica (Figura 3). El genoma tiene un tamaño de 207 Kpb y contiene 136 marcos de lectura (ORFs) (Renault y Novoa, 2004; Swiss Institute of Bioinformatics, 2019).

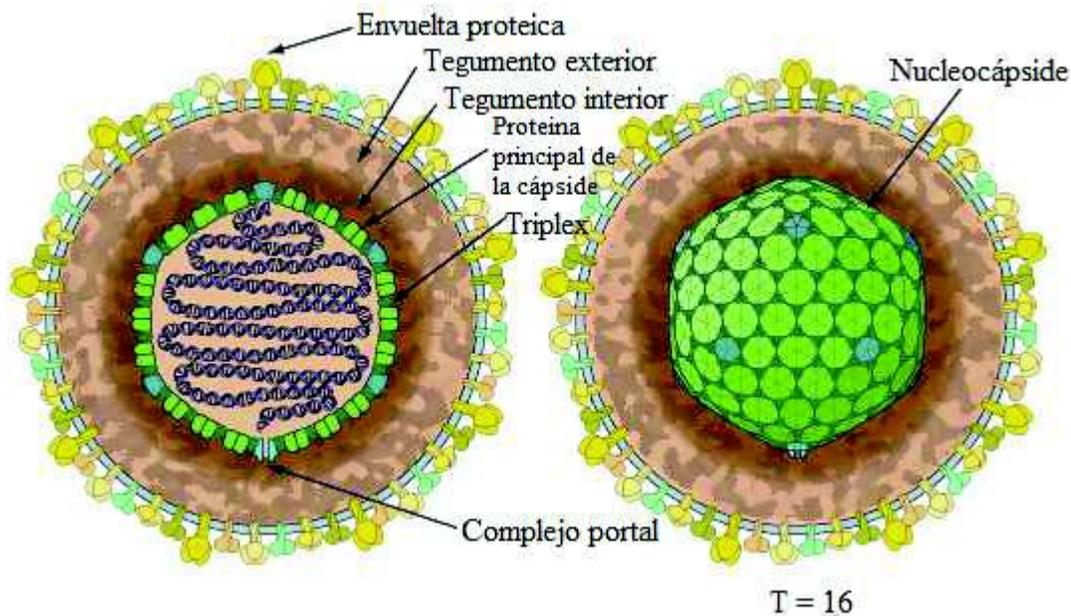


Figura 3. Morfología de Herpesvirus de ostreidos tipo 1. Modificado del Swiss Institute of Bioinformatics (2019).

La infección por OsHV-1 considera afecciones principalmente a *C. gigas* en sus etapas de semilla y juvenil (Vásquez-Yeomans *et al.*, 2004; Martenot *et al.*, 2011), así como a otras especies de bivalvos como *C. angulata*, *C. ariakensis*, *Ostrea edulis*, *Ruditapes philippinarum*, *Ruditapes decussatus* y *Pecten maximus*.

Las temperaturas elevadas del agua de mar parecen ser uno de los posibles factores inductores de la infección por OsHV-1. Además, las condiciones causantes de estrés y en especial las técnicas de crianza, parecen favorecer la infección con este virus. En Francia, durante el verano se realizan traslados de ostras y ello podría amplificar también la transmisión del OsHV-1. Parece difícil definir de manera precisa un umbral de temperatura relativo a la presencia del virus o la aparición de mortalidad por este patógeno. De acuerdo a la literatura, el umbral de temperatura ha sido diferente según el lugar: 22 a 25 °C en la costa Oeste de los Estados Unidos (Friedman *et al.*, 2005; Burge *et al.*, 2007) y 18 a 20 °C en Francia (Soletchnik *et al.*, 1999; Samain *et al.*, 2007).

El ostión *C. gigas* ha tenido episodios de altas mortalidades provocadas por el OsHV-1, los cuales han afectado la producción ostrícola en países como: Europa (Francia, Irlanda, Italia, Holanda, España, Reino Unido), Australia, China, Corea, Japón, Marruecos, México, Nueva Zelanda y Estados Unidos de América; este virus infecta tanto a la semilla como a ostiones juveniles causando grandes pérdidas económicas (Renault y Novoa, 2004; Martenot *et al.*, 2011). En Francia y otros Estados de la Comunidad Europea en los años 2008, 2009 y 2010, las pérdidas se han estimado en más del 90% y se han asociado con el surgimiento de una nueva variedad del OsHV-1 conocida como μ var (Segarra *et al.*, 2010; OIE, 2015).

Desde el año 1997, se han presentado varios episodios de mortalidades inexplicables en el cultivo de *C. gigas* en Baja California y otras localidades del noroeste de México. En las zonas de alta mortalidad los organismos juveniles y adultos presentaban erosiones en las branquias. Estudios recientes con microscopia electrónica de barrido (MET), hibridación *in situ* y análisis histológico confirman la presencia del OsHV-1 en organismos con erosión branquial (Vásquez-Yeomans *et al.*, 2010).

Existen reportes recientes de dos nuevas variantes del OsHV-1, considerando la secuencia nucleotídica del ORF4 descritas en las costas de Sonora. La primera se reportó en el estero La Cruz (Grijalva-Chon *et al.*, 2013) y otra en el estero Morua (De La Re-Vega *et al.*, 2017).

I.3.2. El ciclo viral de OsHV-1

El OsHV-1 tiene un ciclo viral directo, el cual puede ser latente ó virulento, el primero se activa por diversos factores, incluyendo el estadio de vida del ostión y el estrés ambiental, lo que desencadena la replicación viral, a menudo provocando efectos patogénicos en el hospedero (Ben-Horin., 2015). El virus también puede persistir como infección latente en *C. gigas* de manera asintomática a temperaturas menores de 13 °C (Pernet *et al.*, 2015), mientras que la transmisión del OsHV-1 y las mortalidades ocurren cuando la temperatura excede los 16 y hasta los 24 °C (Pernet *et al.*, 2012; Dégremont *et al.*, 2013; Petton *et al.*, 2013; Renault *et al.*, 2014).

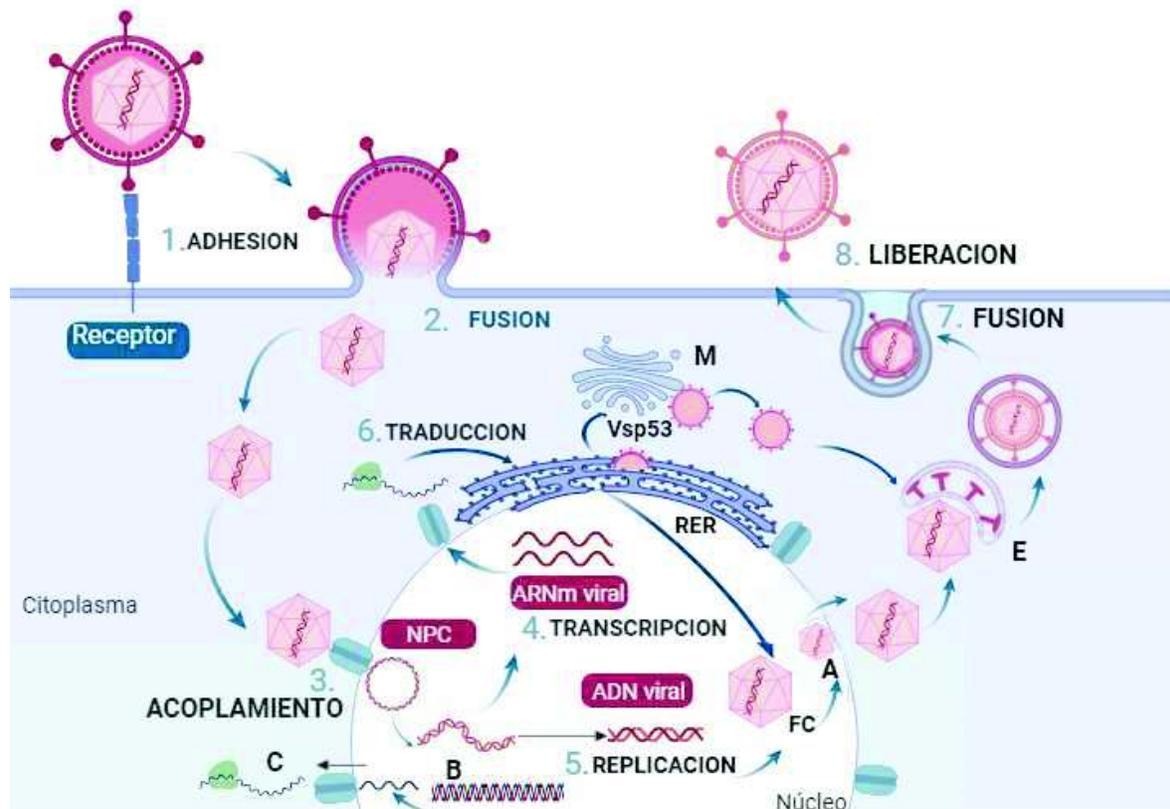


Figura 4. Esquema representando los diferentes pasos de la infección viral de OsHV-1. Modificado de Jouaux *et al.*, 2013.

La Figura 4 representa la infección viral de OsHV-1, que inicia con el reconocimiento de las proteínas virales por los receptores de la membrana del hospedero participando la F-actina citoplasmática con diferentes proteínas, como la talina o vinculina y la talina-2, el cual es el proceso de reconocimiento del virus. Después el virus se une a la membrana, la cápside viral entra a la célula del hospedero, seguido de dos vías distintas: endocitosis dependiente de pH o dependiente de actina cortical.

A través del citoesqueleto el virus es transportado al núcleo, las tubulinas α y β pueden estar involucradas en la entrada de la cápside al núcleo. Se acopla la cápside a la envoltura del núcleo, formando un complejo de poro nuclear (NPC), facilitando la liberación del genoma viral en el nucleoplasma (Jouaux *et al.*, 2013). Posteriormente se llevan a cabo la transcripción y traducción del ARN mensajero viral en el retículo endoplasmático rugoso (RER) para formar proteínas capsídicas y su maduración en el aparato de Golgi para las proteínas de envoltura, enseguida ingresan al núcleo. El ensamblaje del virión se realiza después de la replicación del ADN viral, este es envuelto por las proteínas capsídicas y se forma la cápside (FC). Finalmente, la membrana nuclear libera la partícula viral al citoplasma (A) y las vsp53 intervienen en el transporte de vesículas (M) del aparato de Golgi, la vesícula envuelve al virus (E) y enseguida se fusiona el virión con la membrana de la célula siendo liberado (Jouaux *et al.*, 2013).

No se conoce el tiempo de supervivencia del OsHV-1, la transmisión requiere un contacto directo entre los hospederos, no existe ningún reservorio o vector conocido, aunque hay indicios de que pudiera transmitirse agregado a partículas inertes en suspensión en el agua, mismas que podrían ser filtradas por los moluscos y así ser infectados (Schikorski *et al.*, 2011; Evans *et al.*, 2014). Las fases de vida susceptibles de muerte son la fase larvaria y juvenil ya que las primeras fases muestran una disminución en su alimentación y natación y en pocos días puede morir el 100% de la población. El virus se puede encontrar en organismos adultos, la mayoría de las veces sin presentar mortalidad (Grijalva-Chon *et al.*, 2013; Martínez-García *et al.*, 2017).

Las lesiones asociadas a la infección en los juveniles se observan principalmente en tejidos conjuntivos de órganos como: manto, branquias, glándula digestiva y palpos labiales. Por microscopia electrónica de barrido, las células de tipo fibroblástico muestran núcleos

agrandados con cromatina perinuclear (Figura 5) (OIE, 2012). En juveniles de *C. gigas* infectados por OsHV-1 se observa una degeneración hemocítica, caracterizada por una fragmentación y picnosis nuclear (Friedman *et al.*, 2005).

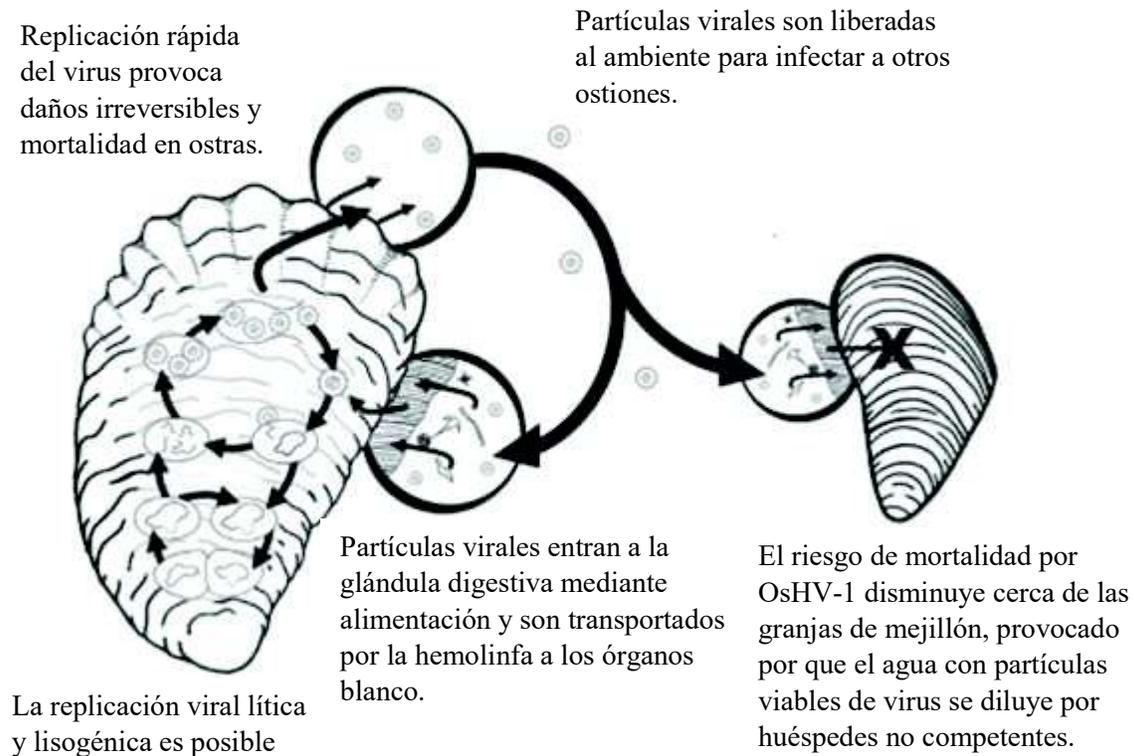


Figura 5. Ciclo de vida de OsHV-1 en *Crassostrea gigas*. Tomado de Ben-Horin *et al.* (2015).

I.4. Las ADN Polimerasas

La importancia de los ácidos nucleicos radica en sus funciones, las cuales son de almacenamiento, expresión y replicación de información genética. El ADN de cada especie tiene una secuencia de bases única, donde las unidades funcionales de información son los genes (Müller-Esterl, 2008). La información que contiene esta secuencia desempeña varias funciones, los genes no funcionan autónomamente, por lo cual dependen de componentes celulares para su perpetuación y funcionamiento, además estas unidades son las que codifican

distintas enzimas, proteínas o moléculas de ARN que participan en las distintas reacciones celulares (Brown, 2008).

La replicación del ADN es un proceso fundamental, ya que se produce una copia idéntica de una doble hélice de ADN. En primer lugar, se deben separar las dos hebras complementarias, cada una de ellas sirve como templado para la síntesis de una hebra complementaria. Para poder iniciar la replicación del ADN *in vitro*, es necesario el uso de cebadores, uno para iniciar la síntesis de la cadena complementaria sobre el polinucleótido líder y otro para cada segmento de ADN discontinuo (Brown, 2008; Karp, 2014). La proteína encargada de replicar el ADN se llama ADN polimerasa, la cual es una enzima que liga desoxirribonucleótidos, es decir dATP, dCTP, dGTP y dTTP, denominados generalmente como dNTPs, todo para formar un nuevo polímero de ADN. Las dos nuevas dobles hélices de ADN son idénticas entre sí pues están compuestas de una hebra hija y una parental siendo una replicación semiconservativa. Las ADN polimerasas trabajan y sintetizan una nueva hebra de ADN siempre en sentido 5' a 3' (Müller-Esterl, 2008).

Las distintas ADN polimerasas se han clasificado en familias, basándose en la homología de su secuencia primaria de aminoácidos con las primeras polimerasas identificadas en *E. coli*. Las ADN polimerasas homólogas a la PolI de *E. coli* se han englobado en la familia A, mientras que las enzimas similares a la subunidad catalítica de la PolII de *E. coli* forman la familia B. La familia C está constituida por las ADN polimerasas homólogas a la PolIII de *E. coli*. La familia D está formada por una serie de ADN polimerasas presentes únicamente en arqueas. Las familias X y Y engloban enzimas presentes tanto en eucariotas como en procariotas y arqueas. La familia X incluye polimerasas implicadas fundamentalmente en procesos de reparación y generación de variabilidad. Por último, la familia Y incluye distintas polimerasas capaces de replicar a través de lesiones en el ADN (Terrados-Aguado, 2010).

Estudios cristalográficos han revelado que las ADN polimerasas poseen una organización estructural común. Presentan un plegamiento en forma de mano con tres subdominios denominados “dedos”, “palma” y “pulgar”. El sitio activo de la polimerasa donde se adicionan los deoxinucleótidos a la cadena creciente, se localiza en el dominio de la palma. El dominio dedos actúa en el reconocimiento y unión de los deoxinucleótidos y en

el dominio pulgar residen contactos con el DNA y el nucleótido entrante (Terrados-Aguado, 2010).

En el caso de las ADN polimerasas virales, estas son esenciales en el proceso de replicación viral, se ha encontrado que el ORF100 del OsHV-1 codifica para una ADN polimerasa putativa, clasificada dentro de la familia B de las polimerasas. Hasta la fecha, este ORF no ha sido caracterizado ni estudiado completamente, solamente se cuenta con el reporte de la secuencia de la ADN polimerasa (Davison *et al.*, 2005).

I.5. El silenciamiento de genes

Actualmente existen técnicas que permiten obtener información de los transcritos de cada proteína, para conocer su función y participación en mecanismos celulares y respuestas fisiológicas, tal es el caso del ARN interferente (ARNi) (Orengo-Ferriz, 2011).

Desde 1990 se cuenta con estudios donde se analizó el proceso de la degradación del ARNm en las petunias. Metzloff *et al.* (1997), observó el fenómeno de co-supresión. Donde la chalcona sintasa, enzima clave en la biosíntesis de antocianinas, los genes *chsA* se activan por transcripción en las células epidérmicas de los pétalos de las flores. Por lo tanto, la pérdida de ARN de *chsA* provoca la pérdida de pigmento de antocianina en los pétalos, y se obtiene flor blanca en lugar de púrpura. Posteriormente para el año 1998, al nemátodo *Caenorhabditis elegans* se le inyectó ARN codificante de una proteína muscular, mientras que a otros se les inyectó ARN no codificante de la proteína y a otro grupo ARN de doble cadena con ambas secuencias unidas entre sí. En los organismos inyectados con el ARN de doble cadena se detuvo la producción de la proteína, definiendo estos procesos como interferencia de ARN (ARNi) (Karp, 2014).

Dentro del proceso de silenciamiento de genes, actualmente se han descrito diversas clases de moléculas de ARN que llevan a cabo el proceso de silenciamiento por interferencia, donde las más estudiadas son los siARN (por sus siglas en inglés, small interfering ARN) y los microARN (miARN) (López *et al.*, 2007).

El ARNi es una respuesta biológica presente en muchos organismos eucariotas, siendo que el ARN de doble cadena (dsARN) es mucho más efectivo para el silenciamiento

que el ARN antisentido (Paddison *et al.*, 2002). Este es un mecanismo de silenciamiento de genes post-transcripcional (Lambeth y Smith 2013). En este proceso el ARN de doble cadena es alcanzado por la ARNasa III llamada Dicer, la cual digiere el ARN en pequeños fragmentos de 21 a 25 nucleótidos llamados siARNs; estos están asociados con el complejo multiprotéico RISC (por sus siglas en inglés RNA-induced silencing complex), el cual degrada el ARNm homólogo y evita la traducción de proteínas (Figura 6; Dykxhoorn y Lieberman, 2005; Aigner, 2006).

Las técnicas de silenciamiento requieren del uso efectivo de la interferencia de ARN, actualmente se encuentran ensayos transitorios donde la expresión de genes se interfiere temporalmente en líneas celulares o en organismos vivos. En los cuales se utilizan siARNs sintetizados químicamente, donde la célula requiere la incorporación a su genoma de elementos necesarios para fabricar una molécula de ARN de doble cadena que llegue al citoplasma, por lo cual se utilizan vectores que producen shARN (small hairpin RNA) o miARN (López *et al.*, 2007).

I.5.1. El ARN de interferencia

Actualmente existen técnicas que permiten obtener información de los transcritos de cada proteína, para conocer su función y participación en mecanismos celulares y respuestas fisiológicas; tal es el caso del ARN interferente (ARNi) (Orengo-Ferriz, 2011).

Desde 1990 se cuenta con estudios donde se apreció la degradación del ARNm en petunias, esto a partir de un estudio para intensificar el color purpura mediante la introducción de copias extra de un gen que codifica para la producción del pigmento. Obteniendo un color menos intenso del esperado, a dicho fenómeno se le denominó desactivación génica postranscripcional (PTGS). Posteriormente para el año 1998, al nematodo *Caenorhabditis elegans* se le inyectó ARN codificante de una proteína muscular, mientras que a otros se les suministró ARN no codificante de la proteína y a otro grupo ARN de doble cadena con ambas secuencias unidas entre sí. En los organismos inyectados con el ARN de doble cadena se detuvo la producción de la proteína, definiendo estos procesos como interferencia de ARN (ARNi) (Karp, 2014).

Dentro del proceso de silenciamiento de genes, actualmente se han descrito diversas clases de moléculas de ARN que llevan a cabo el proceso de silenciamiento por interferencia, donde las más estudiadas son los siARN (por sus siglas en inglés, small interfering RNAs) y los microARN (miARN) (López *et al.*, 2007).

El ARNi es una respuesta biológica presente en muchos organismos eucariotas, siendo que el ARN de doble cadena (dsARN) es mucho más efectivo para el silenciamiento que ARN antisentido (Paddison *et al.*, 2002). Este es un mecanismo de silenciamiento de genes post-transcripcional (Lambeth y Smith 2013). En este proceso el ARN de doble cadena es alcanzado por la ARNasa III llamada Dicer, la cual digiere el ARN en pequeños fragmentos de 21 a 25 nucleótidos, llamados siARNs. Estos están asociados con el complejo multiprotéico RISC (por sus siglas en inglés RNA-induced silencing complex), el cual degrada el ARNm homólogo y evita la traducción de proteínas (Figura 6) (Dykxhoorn y Lieberman, 2005; Aigner, 2006).

Las técnicas de silenciamiento requieren del uso efectivo de la interferencia de ARN, principalmente se encuentran ensayos transitorios, donde la expresión se interfiere temporalmente, y los estables, donde las células o el organismo son interferidos de manera permanente. El primero necesita siARN sintetizados químicamente y en el segundo la célula requiere la incorporación a su genoma de elementos necesarios para fabricar una molécula de ARN de doble cadena que llegue al citoplasma utilizando vectores que producen shARN (small hairpin RNA) o miARN (López *et al.*, 2007).

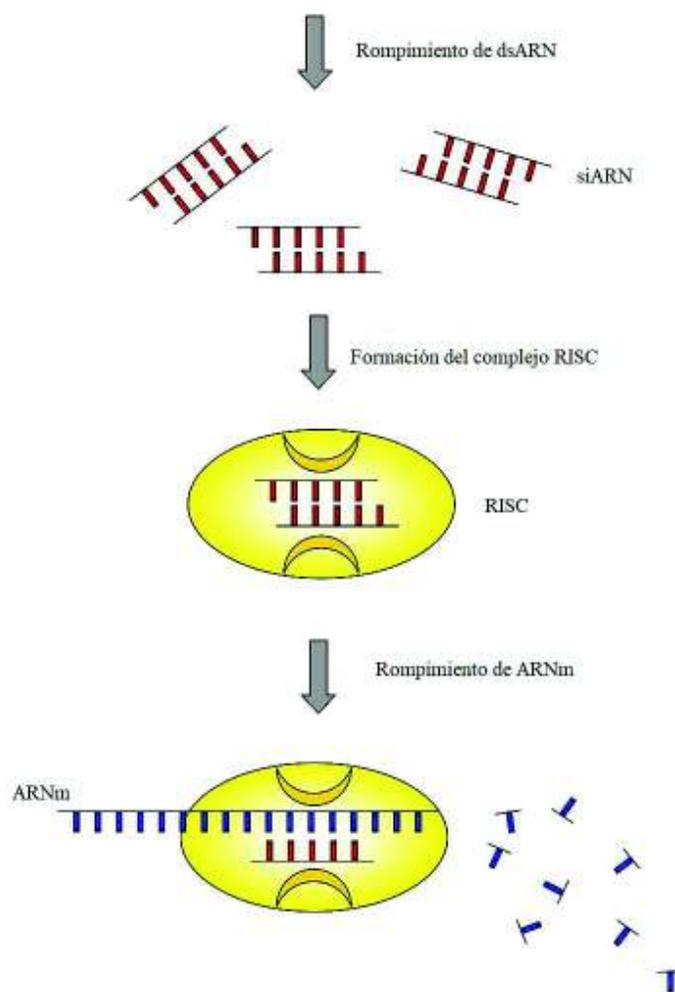


Figura 6. Mecanismo de RNAi (modificado de Mozellin y Provenzano, 2003).

El ARNi ha sido utilizado para manipular la expresión de genes, apagar genes específicos para evaluar los roles fisiológicos y también el control de la infección de un patógeno. El ARNi ha sido probado como un mecanismo efectivo para la supresión de la infección viral o replicación de muchos virus, incluyendo varios patógenos a humanos como poliovirus, HIV-, hepatitis B virus, hepatitis C, influenza A, dengue, SARS coronavirus, entre otros más (Giitlin *et al.*, 2002).

El ARNi se ha utilizado para estudiar virus que infectan especies de interés en la acuicultura como el orfvirus (ORFv) y el virus hemorrágico septicémico (VHSV), ambos virus infectan peces (Shin *et al.*, 2005; Kim y Kim, 2011; Wang *et al.*, 2014; Hamilton *et al.*,

2014). Respecto a los virus que infectan al camarón, se silenciaron genes del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) y al virus de la cabeza amarilla (YSV) (Tirasophon *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2007; Zhu y Zhang 2012); en moluscos, Fabioux *et al.* (2009) realizaron un estudio en *C. gigas* utilizando ARNi para silenciar el gen de crecimiento gonadal beta. Posteriormente Huvet *et al.* (2012) silenciaron el gen vasa que está relacionado con la diferenciación de las células germinales.

Actualmente hay trabajos donde se silenciaron genes implicados en la replicación, en el metabolismo de nucleótidos y en las interacciones huésped-virus; tal es el caso de Wu *et al.* (2007) quienes concluyeron que el ARNi bloquea efectivamente el genoma de WSSV en los genes de la ADN polimerasa, ribonucleotido reductasa subunidad pequeña (rr2), timidina cinasa y timidilatoquinasa (tk-tmk), vp24 y vp28, y que por lo tanto puede ser utilizado para la reducción de la infección de este virus en *Litopenaeus vannamei*. Además, se ha observado que las inyecciones de proteínas recombinantes de VP26 y VP28 inducen resistencia a WSSV en *Penaeus japonicus* (Namikoshi *et al.*, 2004). En el caso específico del silenciamiento de las polimerasas, Wang *et al.* (2014) utilizaron ARNi para la ADN polimerasa del virus *Parapoxvirus* sp. que infecta al ganado, observando que el ARNi promueve la inhibición de la replicación del virus.

I.5.2. El shRNA

Se ha reportado que los shARNs tienen ciertas ventajas sobre los siARNs, pues son más estables, teniendo un efecto más prolongado de silenciamiento y tienen más alternativas de entregar el ARNi (McIntyre y Fanning, 2006; Moore *et al.*, 2010). Los shARNs son moléculas que forman una estructura del tipo tallo-asa, a partir de una hebra que codifica para la secuencia sentido (19 nt), seguido de 5-10 nt en forma de horquilla y la secuencia antisentido complementaria de 19-29 nt, los cuales son procesados por Dicer y forman siARNs. Se requiere que la célula incorpore a su genoma los elementos necesarios para fabricar una molécula de ARN de doble cadena que llegue hasta el citoplasma. Esto se logra a partir de vectores que producen shARNs o miARNs, los cuales se introducen en la célula, pudiéndose producir a partir de la maquinaria celular. Regularmente este vector será un

plásmido diseñado para este propósito. Una de las ventajas de esta estrategia es que se pueden seleccionar las células en las que este vector se integre al genoma de la célula; en este caso todas las células hijas tendrán integrado el vector y por lo tanto, toda la población estará permanentemente silenciada (Ortiz-Quintero, 2009).

En el 2005 Xie *et al.* utilizaron siARNs y shARNs para estudiar el iridovirus que infecta a peces, silenciando el gen reportero lacZ y proteínas capsídicas del iridovirus en células FHM (células musculares), obtuvieron que los genes de la proteína de la cápside (MCP) se redujeron considerablemente, por lo que el silenciamiento de genes es aplicable en organismos acuáticos. Así mismo, Clarke *et al.* (2017) inhibieron la replicación del virus hemorrágico septicémico que infecta al pez zebra. Es por esto que las terapias basadas en ARNi, especialmente en infecciones virales, se vuelven cada vez más interesantes y prometedoras como una herramienta poderosa, pues juegan un rol importante en la protección del huésped, suprimiendo la transcripción del genoma viral y bloqueando la replicación viral.

II.HIPOTESIS

El silenciamiento del gen que codifica para la ADN polimerasa del Herpesvirus de Ostreidos tipo 1 reducirá la infección en *Crassostrea gigas*.

III.OBJETIVOS

III.1. Objetivo general

Silenciar el gen de la ADN polimerasa del Herpesvirus de Ostreidos tipo 1 durante la infección en *Crassostrea gigas*.

III.2. Objetivos particulares

1. Diseñar un shRNA dirigido al gen que codifica para la ADN polimerasa del OsHV-1 y clonarlo dentro de un vector.
2. Realizar un bioensayo de infección en *C. gigas* para silenciar el gen de la ADN polimerasa del OsHV-1.
3. Medir el nivel de silenciamiento del gen que codifica para la ADN polimerasa del OsHV-1.
4. Valorar la citotoxicidad del shRNA-ADNpol y daño en tejido de *Crassostrea gigas* por OsHV-1.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Diseño y obtención del shRNA dirigido al gen que codifica a la ADN polimerasa del OsHV-1

Para el diseño del shRNA se utilizaron los programas disponibles en internet, como genelink (<http://www.genelink.com/sirna/shrnai.asp>) y Ambion (<http://www.ambion.com/>). El diseño del shRNA para la ADN polimerasa del OsHV-1 se basó en la secuencia YP024639 del Genbank (Davison *et al.*, 2005). Para la clonación de los shRNA se utilizó el vector pAAV-AC-GFP de Origene (Rockville, MD), el cual cuenta con una secuencia del gen que codifica para la proteína verde fluorescente. Los constructos shRNA-vector se transformaron en bacterias *Escherichia coli* Top 10 por choque térmico, el cual constó en agregar 1 μ L del vector-shRNA en un tubo de reacción de 1.5 μ L, el cual contenía una solución de 50 μ L de bacterias Top 10 competentes. Posteriormente el tubo se colocó en hielo por 30 minutos, seguido de una incubación a 42°C por 30 segundos y enseguida se colocó en hielo durante 5 minutos, posteriormente se agregaron 250 μ L de medio SOC (2% triptona, 0.5% extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2.5 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 MgSO₄ y 20 mM de glucosa) y se incubó a 37°C a 225 rpm por 1 hora. Para realizar la selección de las bacterias transformadas estas se crecieron en placas con medio LB ampicilina (10 μ L/100 mL). El crecimiento se realizó por plaqueo, agregando 20, 50 y 100 μ L del medio con las bacterias transformadas y posteriormente se incubaron a 37° durante 24 horas. De las colonias obtenidas, se tomó una y se aisló en una placa nueva con medio LB ampicilina y se incubó durante 24 horas a 37°C. La colonia aislada se sembró en medio LB líquido con ampicilina y se incubó a 37° por 24 horas.

Para la extracción del ADN plasmídico se utilizó el kit PowerPrep versión mini de Origene (Rockville, MD, USA). Primero se inició con el equilibrio de la columna agregando 2 mL de buffer de equilibrio, seguido se tomaron 3 mL del medio LB líquido con las bacterias transformadas y se centrifugaron a 12000 \times g por 5 minutos. Al agregado bacteriano se le añadieron 400 μ L de buffer de resuspensión con RNAsa y se homogenizó con agitación suave, posteriormente se agregaron 400 μ L de buffer de lisis, se mezcló invirtiendo el

microtubo y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Después se agregaron 400 μ L de buffer de neutralización y se homogenizó por inversión del tubo, para posteriormente centrifugar a 12000 \times g por 12 minutos. El sobrenadante obtenido se agregó a la columna equilibrada dejando drenar toda la solución, seguido se agregaron 2.5 mL de buffer de lavado descartando el líquido drenado, repitiéndose este paso una vez más. Ya que paso el sobrenadante por la columna, se agregaron 900 μ L de buffer de elusión, dejando pasar por gravedad y se colectó el líquido en un tubo estéril de 1.5 mL. Enseguida se agregaron 630 μ L de isopropanol frío y se centrifugó a 12000 \times g a 4°C por 30 minutos, se descartó el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol al 70% frío y se centrifugó a 12000 \times g a 4°C por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se dejó secando el pellet durante 10 minutos. Por último, se agregaron 50 μ L de buffer TE y el ADN se guardó a -20°C.

Para confirmar la presencia del shRNA se realizó un PCR, utilizando los oligos VP 1.5 y XL39 proporcionados por la casa comercial ORIGENE, para obtener un amplicón de 550 pares de bases. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial por 5 minutos a 95°C, 30 ciclos a 95°C por 30 segundos, 51°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto y extensión final a 72°C por 10 minutos. Las condiciones de reacción fueron: 1 μ L de ADN plasmídico, 5 μ L de Taq polimerasa (High fidelity taq polymerase), 10 μ M de cada oligonucleótido y 16 μ L de agua libre de nucleasas. Los productos de PCR se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y teñidos en Bromuro de Etidio (EtBr), que se visualizaron utilizando un sistema fotodocumentador DNR BIO-Imaging Systems MiniBIS Pro[®] (BioAmerica Inc.) con luz ultravioleta.

IV.2. Obtención de inóculo viral de OsHV-1

A partir de ostiones infectados con OsHV-1, se pesaron 7g de tejido y se homogenizó mecánicamente en solución salina isotónica, obteniéndose una pasta, la cual se centrifugó a 5000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones, repitiendo el proceso nuevamente. Se tomó la fase acuosa la cual contiene el virus OsHV-1 y se resguardó en hielo.

Se tomó un alícuota de inóculo viral y se midió el número de copias del virus por PCR en tiempo real con los iniciadores ADNpol reportados por De La Re-Vega, *et al.* (2017).

IV.3. Bioensayo: Infección de *Crassostrea gigas* con el OsHV-1 y la interferencia con el shRNA dirigido a la proteína ADN polimerasa del OsHV-1

Se obtuvieron organismos juveniles de ostión de los cultivos comerciales en Bahía de Kino, Sonora, los cuales fueron trasladados al Laboratorio de Histología del DICTUS de la Universidad de Sonora y, fueron aclimatados en acuarios de 16 L en agua de mar, con aireación y temperatura de 25°C constantes. Posteriormente se realizó un orificio a un costado de la concha de los organismos y se tomó una muestra de hemolinfa, de la cual se extrajo ADN utilizando el kit Direct PCR Master (Jena Bioscience) y se realizó un PCR utilizando los oligos ADNpol reportados por De La Re-Vega *et al.* (2017) para determinar que los organismos estuvieran libres del OsHV-1.

Se llevó a cabo el bioensayo con 120 organismos libres de OsHV-1, de los cuales se tomaron 60 ostiones y se les inyectó 50 µL del inóculo viral de OsHV-1 y se separaron en dos grupos: el primer grupo de 30 ostiones se colocó en un acuario de 20 L y después de 12 horas de infección se les inocularon 100 µL (0.5 ng/mL) del RNA de interferencia shRNA-ADNpol. El segundo grupo de 30 organismos fueron los organismos infectados con el OsHV-1 y sin agregar el shRNA-ADNpol. A un tercer grupo de 30 ostiones libres del OsHV-1, se les inoculó el shRNA-ADNpol, dicho grupo se utilizó para evaluar la citotoxicidad del shRNA. Un cuarto tratamiento consistió en 30 ostiones inoculados sólo con solución salina, los cuales sirvieron como control del experimento.

Para cada hora post-infección (12, 24, 48, 72, 108 y 156 hpi), se colectaron 4 organismos a los cuales se les disectó el tejido de branquia. Los tejidos resultantes se guardaron en etanol 96% a -20°C. También se realizó un corte dorsoventral del organismo y, se colocó en casetes histológicos y se guardó en solución Davidson, posteriormente en etanol al 80%. Se realizó un seguimiento de mortalidades a lo largo del experimental.

VI.4. Extracción de ADN genómico

Se tomaron 25 mg del tejido de branquias guardados en etanol al 96% de los organismos de cada tratamiento y se colocaron en tubos de 1.5 ml para realizar la extracción de ADN con el juego de reactivos QIAamp DNA mini kit siguiendo las instrucciones del fabricante (QIAGEN). En seguida se resguardaron las muestras a -20°C. Se midió la concentración y pureza por el cociente de absorbancias A_{260}/A_{280} en un espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific).

Para corroborar la infección experimental se realizó un PCR de punto final utilizando los cebadores rtADNpolF y ADNpolER reportados por de la Re-Vega *et al.* (2017), utilizando las siguientes condiciones: 95°C por 10 minutos, 35 ciclos de 95°C por 15 segundos, 62°C por 15 segundos y 72°C por 15 segundos, con una extensión final a 72°C por 2 minutos. Los fragmentos obtenidos de PCR se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y teñidos en Bromuro de Etidio (EtBr), que se visualizaron utilizando un fotodocumentador DNR BIO-Imaging Systems MiniBIS Pro® (BioAmerica Inc.) con luz ultravioleta.

VI.5. Curvas estándar para PCR en tiempo Real (qPCR)

Se realizaron curvas estándar para medir la carga viral que fue inoculada a los ostiones. Las curvas estándar se corrieron con productos de PCR punto final, amplificados para el gen de la ADN polimerasa con el kit Cristal Taq Master (2×) (Jena Bioscience) y purificados con Agarose Gel Extraction Kit (Jena Bioscience), cuyo subproducto se cuantificó en NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific). Se utilizó como templado ADN genómico del inóculo viral. El número de copias se determinó a partir del producto cuantificado y utilizando la siguiente fórmula (<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>):

$$\text{Número de copias} = \frac{\text{Concentración de templado (ng)} \times (6.022 \times 10^{23})}{\text{tamaño del fragmento (pb)} \times (1 \times 10^9) \times (650)}$$

Se prepararon 7 diluciones seriadas 1:10 (v/v) a un volumen final de 50 μL . La qPCR se realizó en el equipo LightCycler® 480 II (ROCHE) utilizando el kit iQ Syber Green supermix (Biorad) con reacciones a volumen final de 15 μL , utilizando 1 μL de cada dilución incluida y por triplicado, 0.45 μL de cada oligonucleótido a una concentración de 300 nM, 7.5 μL Iq™ SYBR Green supermix (Biorad) y 5.6 μL de H₂O libre de nucleasas. Se utilizaron las siguientes condiciones: 95°C por 10 min, 35 ciclos de 95°C por 15 seg, 62°C por 15 seg y 72°C por 15 seg, un ciclo de 72°C x 5 min.

VI.6. Confirmación del silenciamiento por PCR de tiempo real

Una vez obtenida la curva estándar del gen de la ADNpol, se evaluó el silenciamiento mediante la técnica de qPCR, utilizando las muestras de ADN genómico como templado. Se llevaron a cabo reacciones con volumen final de 12.5 μL por triplicado utilizando 1 μL de cada muestra a una concentración de 100 ng/ μL y por triplicado, 0.5 μL de cada oligonucleótido a una concentración de 5 pM, 6.5 μL Iq™ SYBR Green supermix (Biorad) y 4 μL de H₂O libre de nucleasas. Se utilizó el siguiente programa del termociclador: 95°C por 10 min, 35 ciclos de 95°C por 15 seg, 62°C por 15 seg y 72°C por 15 seg, un ciclo de 72°C por 5 min.

VI.7. Análisis estadístico

Se realizaron pruebas de homogeneidad de varianzas a los datos de la cuantificación absoluta del número de copias virales para cada tratamiento a las distintas horas post infección. Los datos se analizaron con una prueba de F considerando un intervalo de confianza del 95% ($p=0.05$).

Además, se realizaron pruebas de normalidad y homocedasticidad de los datos obtenidos del número de copias de ADN de la polimerasa viral de los diferentes tratamientos. Se llevaron a cabo análisis de varianza (ANOVA) de una vía y para discriminar diferencia entre las medias se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, con un intervalo de confianza del 95% ($p=0.05$).

IV.8. Análisis histológico: ensayo de Tunel y tinción Hematoxilina Eosina

Las muestras obtenidas a partir de cortes dorsoventrales de los ostiones de cada tratamiento se colocaron en solución Davidson por un tiempo de 24 horas y se pasaron a alcohol al 80%. Seguido del proceso de deshidratación (Tabla 2), en el cual el agua que contienen los tejidos se sustituye progresivamente por alcohol y seguido por xileno. Posteriormente, las muestras se embebieron en parafina, obteniendo bloques, los cuales ya solidificados, fueron cortados con un micrótopo rotativo semiautomático (Slee Medical GmbH), obteniendo cortes de 5 μm , obteniendo dos laminillas por cada hora post infección de cada tratamiento. Los cortes se colocaron en un baño de tejido a 45°C y posteriormente se situaron en portaobjetos rotulados, enseguida se eliminó el exceso de parafina colocando los portaobjetos en una estufa a 80°C. Por último, las muestras fueron teñidas mediante la tinción Hematoxilina de Harris y Eosina (Lightner, 1996). Las muestras ya teñidas se montaron con resina Entellan para posteriormente observarse en un microscopio de fluorescencia invertido digital EVOS™ FL Invitrogen™ utilizando luz blanca.

Tabla 2. Deshidratación de tejidos con etanol a diferentes concentraciones y tinción de tejidos mediante la técnica de Hematoxilina-Eosina (Lightner, 1996).

Paso	Deshidratación de tejidos	Tiempo	Tinción de tejidos	Tiempo
1	Etanol 70%	1 hora	Xileno	5 minutos
2	Etanol 80%	1 hora	Xileno	5 minutos
3	Etanol 80%	1 hora	Etanol:Xileno (1:1)	1 minuto
4	Etanol 95%	1 hora	Etanol absoluto	16 sumergidas
5	Etanol 95%	1 hora	Etanol absoluto	16 sumergidas
6	Etanol Absoluto	1 hora	Etanol 95%	16 sumergidas
7	Etanol Absoluto	1 hora	Etanol 95%	16 sumergidas
8	Etanol:Xileno (1:1)	1 hora	Agua corriente	Enjuagar y cambiar agua
9	Xileno	1 hora	Hematoxilina	8 minutos
10	Xileno	1 hora	Agua corriente	Enjuagar
11	Parafina	1 hora	Alcohol ácido	10 sumergidas
12	Parafina	1 hora	Agua amoniacal	25 sumergidas
13			Agua corriente	25 sumergidas
14			Eosina	8 minutos
15			Etanol 95%	16 sumergidas
16			Etanol 95%	16 sumergidas
17			Etanol absoluto	16 sumergidas
18			Etanol absoluto	16 sumergidas
19			Etanol:xileno	1 minuto
20			Xileno	5 minutos
21			Xileno	5 minutos
22			Montaje con resina Entellan	

Para el ensayo de tunel se utilizó el Kit Click-iT TUNEL Alexa Fluor Imaging Assay (Thermo Fisher), donde se realizaron cortes de 5 μm y se colocaron en laminillas, se realizaron lavados, siguiendo la secuencia de la Tabla 3.

Tabla 3. Desparafinación e hidratación de laminillas para técnica de túnel.

Paso	Reactivo	Tiempo
1	Xileno	5 minutos
2	Xileno	5 minutos
3	Alcohol-Xileno	3 minutos
4	Etanol absoluto	3 minutos
5	Etanol absoluto	3 minutos
6	Etanol 95%	3 minutos
7	Etanol 85%	3 minutos
8	Etanol 75%	3 minutos
9	Etanol 50%	3 minutos
10	NaCl 0.85%	5 minutos
11	1X PBS	5 minutos

En seguida se sumergieron las laminillas en 4% paraformaldehído por 15 minutos a 37°C. Posteriormente se lavaron 2 veces en solución PBS por 5 minutos. Se cubrieron las laminillas con proteinasa K y se incubó durante 15 minutos en cámara húmeda, se lavaron las secciones con PBS durante 5 minutos, después en paraformaldehído al 4% a 37°C por 5 minutos, 2 lavados con PBS durante 5 minutos y un lavado con agua desionizada.

Se incubaron las laminillas con el buffer 1X DNasa I por 30 minutos a temperatura ambiente y se procedió a la reacción TdT, agregando 100 µL de buffer TdT se incubó por 10 minutos a 37°C. En seguida se agregaron 50 µL del mix compuesto por: TdT buffer de reacción, EdUTP y la enzima TdT, incubándose por 1 hora a 37°C en cámara húmeda. Se lavó con agua desionizada, 3% BSA con triton 0.1% triton X-100 en PBS por 5 minutos y se enjuagaron las laminillas en 1X PBS. Se realizó la reacción Clic It Plus, agregando 50 µL del mix compuesto de Clic kit Tunel Supermix y 10X Clic kit Plus Tunel Reaction, cubriendo todo el tejido, por 30 minutos a 37°C protegiendo de la luz.

Se removió el mix de reacción y se lavó con 3% BSA en PBS por 5 minutos, protegiendo de la luz. Se agregaron 100 µL de 1X Hoechst 33342, se incubó por 15 minutos

a temperatura ambiente, protegiendo de la luz. Se lavaron dos veces las laminillas con PBS. Por último, se lavaron las laminillas con agua desionizada, y se visualizaron los tejidos un microscopio confocal Leica DMI8, en el laboratorio de microscopia electrónica del CIBNOR, unidad La Paz, Baja California Sur.

V. RESULTADOS

V.1. Obtención de constructo vector shRNA

Se obtuvieron colonias aisladas de bacterias *E. coli* Top 10 transformadas con el vector-shRNA el cual va dirigido al dominio de la palma de la ADN polimerasa del Herpes virus de Ostreidos tipo 1 (Figura 7).



Figura 7. Colonias de bacterias *E. coli* Top 10 transformadas con el constructo vector-shRNA.

Como se puede observar en la Figura 7, el círculo color rojo indica la colonia a la cual se le extrajo el ADN plasmídico para realizar el PCR utilizando los iniciadores específicos que flanquean el shRNA, VP1.5: 5' GGACTTTCCAAAATGTCG 3' y XL39: 5' ATTAGGACAAGGCTGGTGGG 3' (Origene). En la electroforesis se visualizó el ADN plasmídico, el cual presentó un mayor tamaño debido a su alto peso molecular y a que se encuentra como ADN circular, también se puede deber a que se encuentra formando concatémicos de ADN, ya que se esperaba un tamaño de 5.4 Kpb. El producto de PCR presentó un tamaño de 550 pb el cual es el indicado para el fragmento del shRNA (Figura 8).

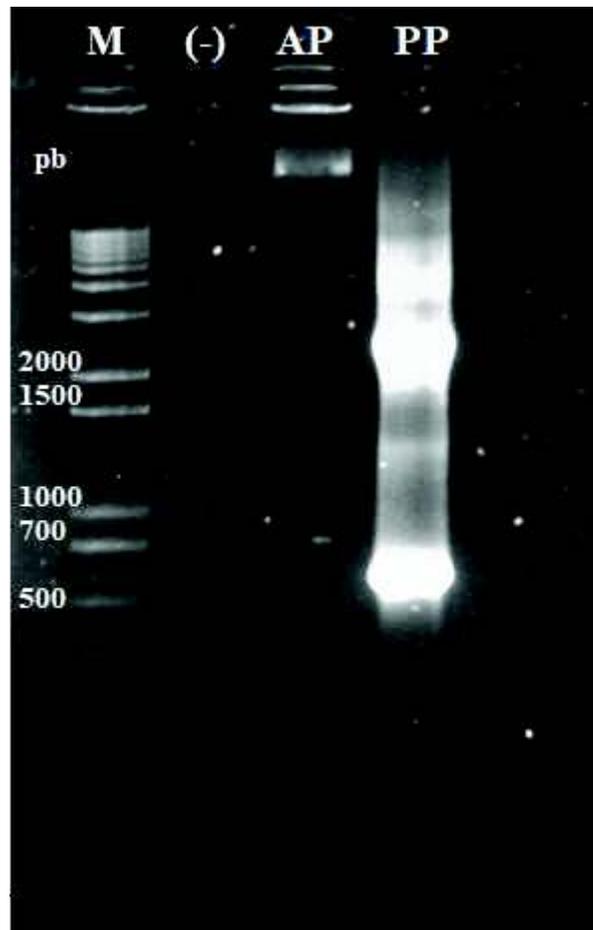


Figura 8. Electroforesis en agarosa al 1.5% del ADN plasmídico purificado y los productos de PCR. M: marcador molecular. (-): control negativo. AP: ADN plasmídico total. PP: producto de PCR del ADN plasmídico.

V. 2. Verificación del OsHV-1 en ostiones sanos

Con la finalidad de verificar que los organismos utilizados en el experimental se encontraban libres del OsHV-1, se analizaron los ostiones a partir de muestras de hemolinfa y se llevó a cabo un PCR con los iniciadores ADNpol. No se detectó el OsHV-1 en la hemolinfa de los organismos colectados, por lo que con dichos organismos analizados se procedió a realizar el bioensayo de infección y silenciamiento, así mismo esto sirvió para realizar la cuantificación del número de copias virales durante la obtención de muestras en el bioensayo (Figura 9).

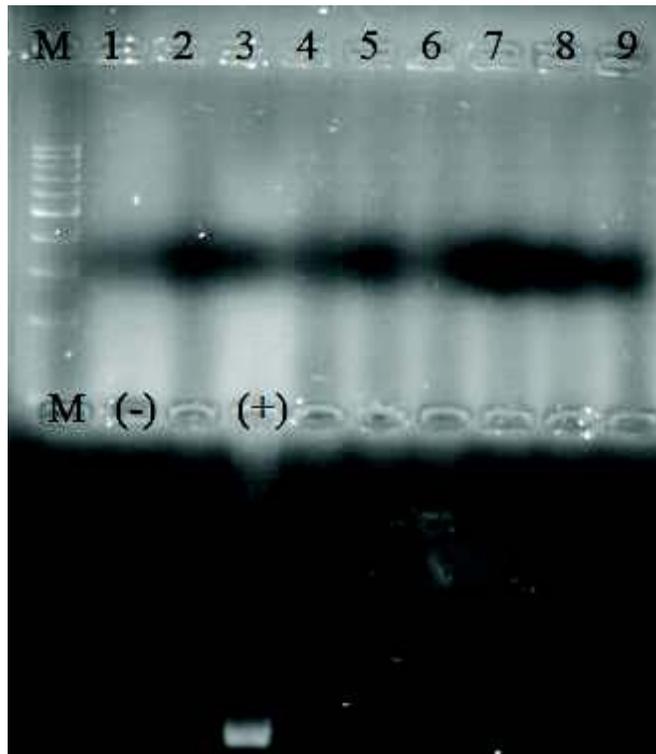


Figura 9. Diagnóstico para el OsHV-1 realizado a muestras de hemolinfa de ostiones utilizados en el experimental de infección, procedentes de La Cruz en Bahía de Kino, Sonora. Carril 1-9 mezcla de muestras de hemolinfa; (+) Control positivo al OsHV-1; (-) Control negativo al OsHV-1; (M) Marcador de peso molecular 200 bp DNA Ladder (Jena Bioscience).

V.3. Seguimiento de mortalidades

En el monitoreo del bioensayo, pasadas las 12 hpi en algunos organismos de la tina de infección, se pudieron observar los primeros signos de infección incluyendo letargia (reacción lenta al tacto) y mortalidades. A las 48 y 72 hpi se notó mayor lentitud al cierre de valvas, se encontraban organismos moribundos, manto retraído y prácticamente no había cierre de valvas, obteniéndose 5 organismos muertos. Mientras que, para los organismos infectados y tratados con el shRNA, se observó la primer mortalidad a las 24 hpi, manteniéndose de esa hora post infección en adelante sin más mortalidades hasta el fin del bioensayo, con un total de 3 mortalidades. Se presentaron 2 organismos muertos del tratamiento inyectado con el shRNA (Figura 10).

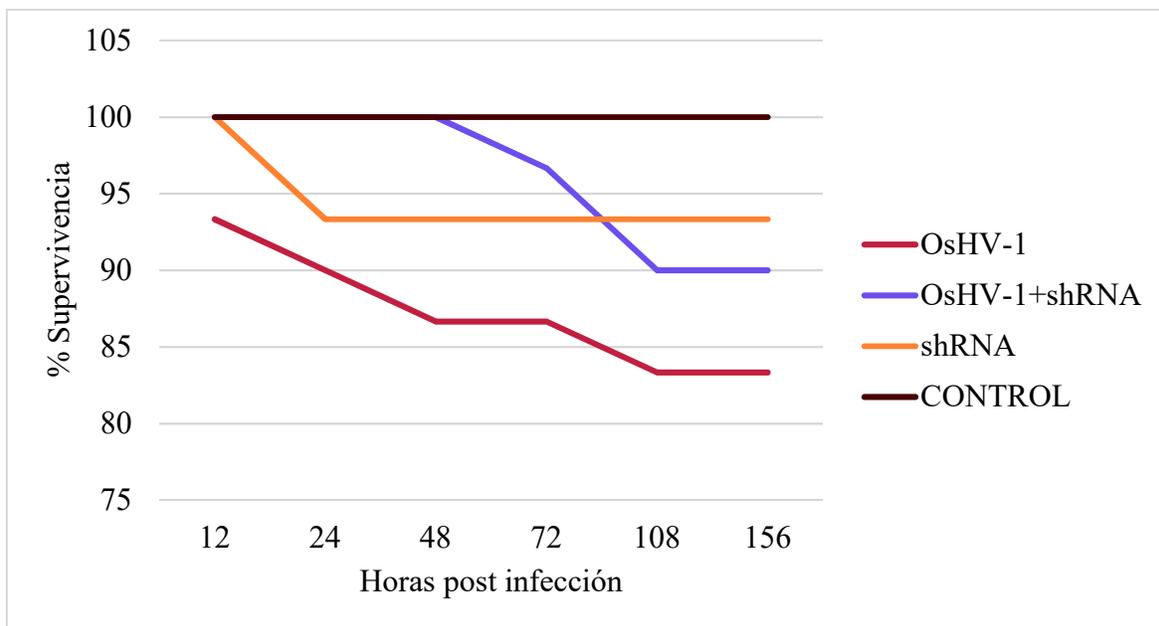


Figura 10. Gráfica de la supervivencia de los organismos en los diferentes tratamientos durante el bioensayo. OsHV-1: tratamiento de organismos infectados con el virus. OsHV-1+shRNA: tratamiento de organismos infectados e inyectados con el RNA de interferencia. shRNA: tratamiento de organismos inyectados con RNA de interferencia. Control: tratamiento de organismos inyectados con solución salina.

V. 4. Verificación del OsHV-1 en organismos de los diferentes tratamientos

Se realizó el diagnóstico de las muestras de branquias de los distintos tratamientos, utilizando los iniciadores rtADNpolIF y ADNpolLERV, los cuales amplifican un fragmento de 177 pb. Los análisis de PCR detectaron los amplicones de ADN del Herpes Virus de Ostreidos 1 de los organismos infectados en el bioensayo. En las Figuras 11 y 12 se observa la banda esperada de 177 pares de bases para los organismos infectados.

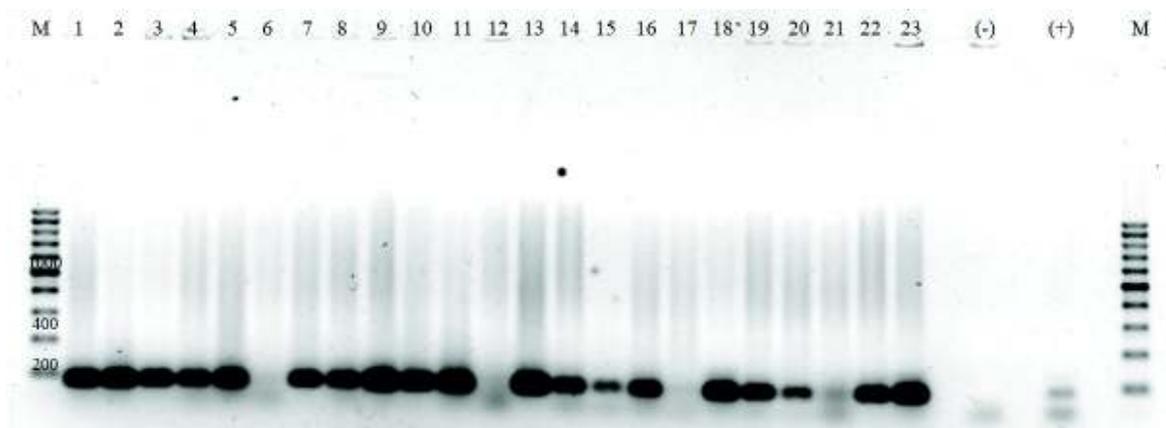


Figura 11. Electroforesis en Agarosa al 1.5% del ADN genómico del tratamiento de organismos infectados con OsHV-1 + shRNA. M: marcador molecular. 1-4: 24 hpi. 5-8: 48 hpi. 9-13: 72 hpi. 14-19: 108 hpi. 20-23: 156 hpi. (-): Control negativo. (+): Control positivo.

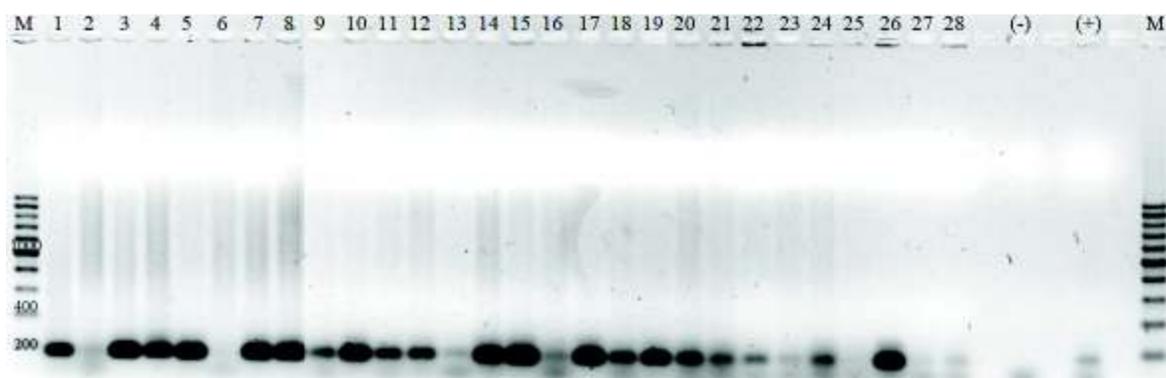


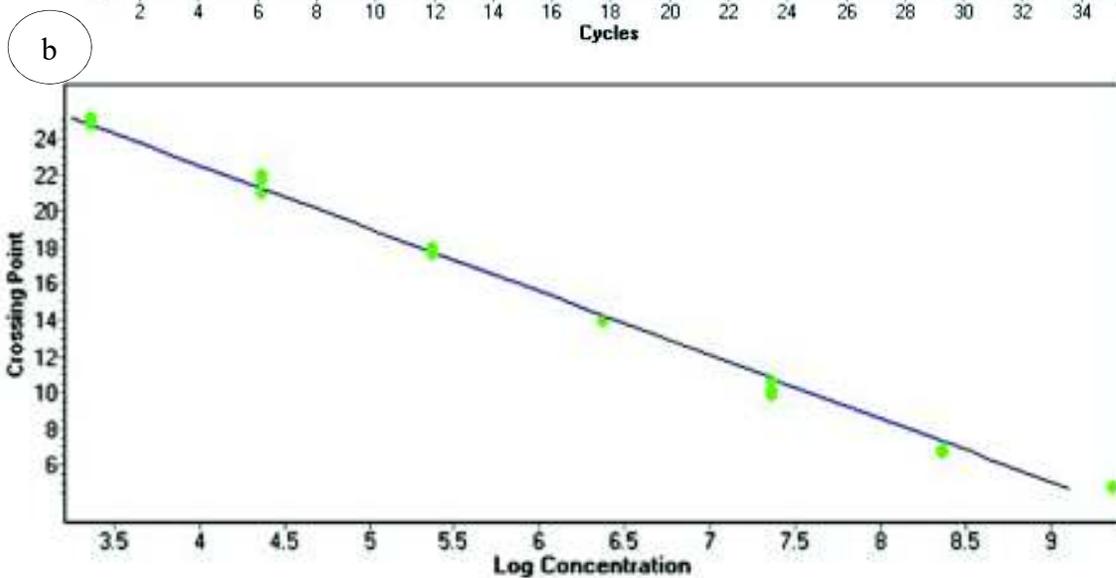
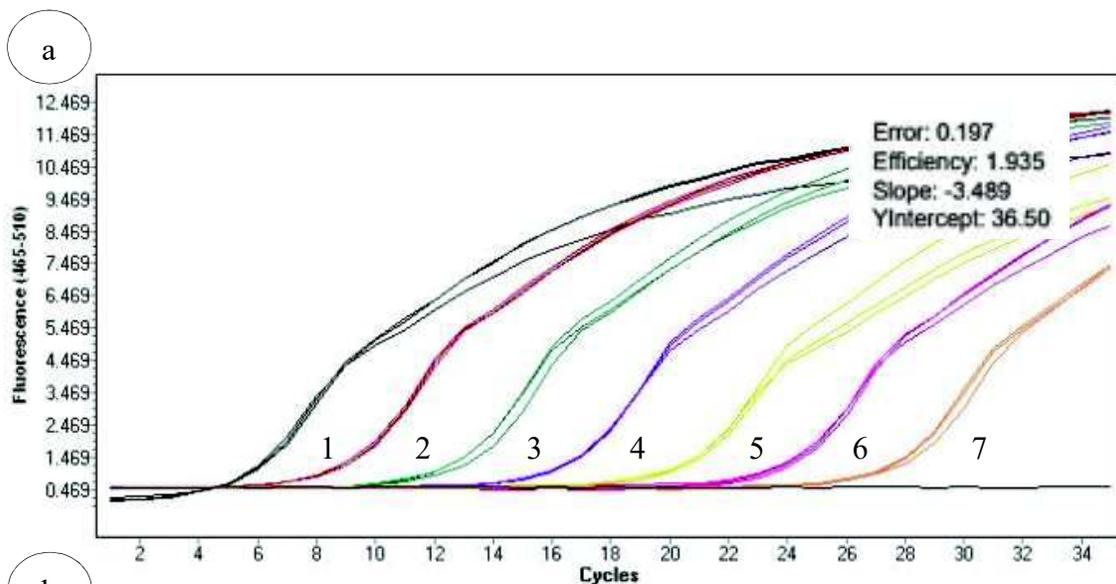
Figura 12. Electroforesis en Agarosa al 1.5% del ADN genómico del tratamiento de organismos infectados con OsHV-1. M: marcador molecular. 1-4: 12 hpi. 5-8: 24 hpi. 9-12: 48 hpi. 13-16: 72 hpi. 17-21: 108 hpi. 22-25: 156 hpi. 26-28: Inóculo viral. (-): Control negativo. (+): Control positivo.

V. 5. Confirmación del silenciamiento por PCR tiempo real

Para dar inicio con la cuantificación del número de copias virales del bioensayo, primeramente, se realizaron las curvas estándar para el gen de la ADNpol viral, para las

cuales se obtuvo una eficiencia de 93% proporcionando mayor confiabilidad en los datos analizados.

En las curvas de disociación no se observó inespecificidad, teniendo una temperatura de disociación de 82.74°C.



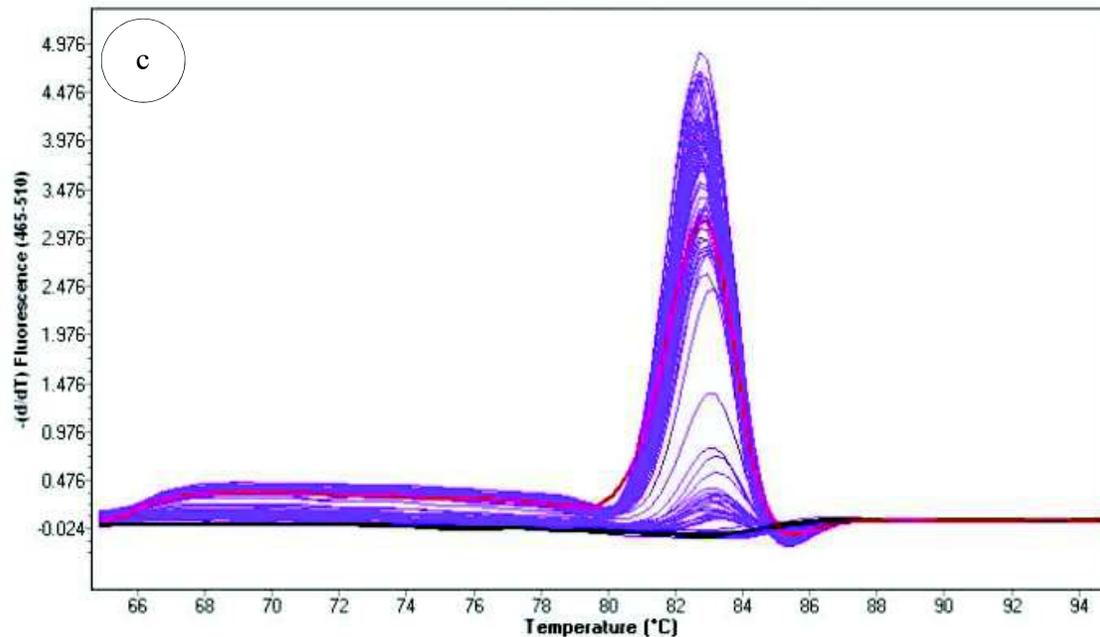
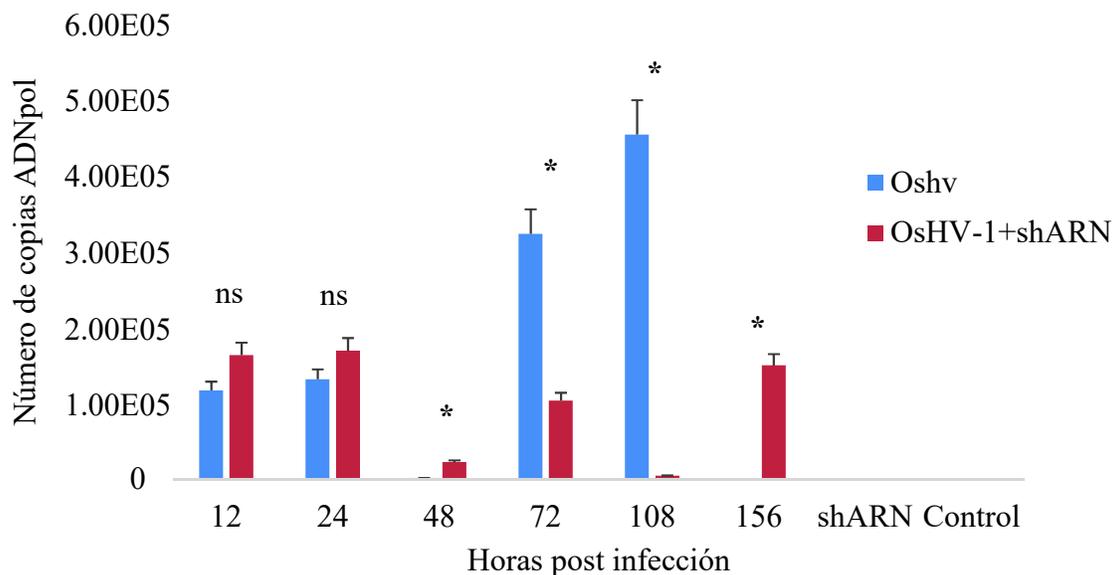


Figura 13. Curva estándar para ADNpol para determinar carga viral del inóculo y muestras del experimental. A) Se muestran las señales fluorescentes de las seis diluciones seriadas. De 1-7 se tiene 1.24×10^9 a 2.10×10^3 copias. B) Curva estándar de la concentración de las diluciones seriadas. Eficiencia: 93.5%, pendiente: -3.489. C) Curva de disociación del amplicón de la ADNpol. La temperatura de disociación fue de 82.74°C.

Usando la curva estándar se procedió a calcular el número de copias del gen de la ADNpol, comparando cada uno de los tratamientos a las distintas horas post infección y entre horas post infección de cada tratamiento (Figura 14).

Los tratamientos de organismos inyectados con solución salina isotónica y el de organismos inoculados con el shRNA, en ambos tratamientos no hubo detección del OsHV-1. A las 12 y 24 horas post infección no se observaron diferencias significativas entre el tratamiento de organismos infectados y organismos infectados+shARN. Para las 72 y 108 horas de infección los organismos infectados + shARN presentaron un menor número de copias virales en comparación con los organismos infectados, contrario a lo que ocurre a las 48 y 156 hpi, teniendo mayor número de copias los organismos infectados + shARN.



OsHV-1	ab	ab	a	ab	b	a
OsHV-1	c	c	ab	bc	a	c
+shRNA						

Figura 14. Gráfica de la expresión absoluta del gen ADNpol en branquias de *C. gigas* durante el experimento. Barras azules: tratamiento de organismos infectados con el virus (OsHV-1). Barras rojas: tratamiento de organismos infectados e inyectados con el shRNA de interferencia (OsHV-1+shRNA). shARN: tratamiento de organismos no infectados e inyectados con RNA de interferencia. Control: tratamiento de organismos no infectados e inyectados con solución salina. Las letras indican diferencia significativa a Asterisco: diferencia significativa, $p < 0.05$. ns: no hay diferencia significativa.

Los organismos infectados por OsHV-1 muestran diferencias significativas en el número de copias entre las 48 y 156 hpi con el número más bajo de copias, comparado con las 108 horas de infección la cual presentó mayor número de copias durante el bioensayo. Mientras que el tratamiento de organismos infectados +shRNA a las 48, 72 y 108 presentaron el menor número de copias virales comparado con las 12, 24 y 156 horas (Figura 14).

V. 6. Análisis de túnel

La apoptosis celular se detectó mediante el análisis de túnel en las diferentes horas post infección para los distintos tratamientos. En las Figuras de la 15 a la 21, el color azul muestra el ADN sin fragmentación, el color verde se debe a la proteína verde brillante (GFP) marcador que se encuentra en el vector y el color rojo indica el ADN fragmentado o células en proceso de apoptosis. Las branquias con mayor cantidad de tejido conectivo apoptótico, se presenta a las 12 horas de infección tanto para tratamiento de organismos infectados por OsHV-1, así como para los organismos infectados + shRNA (Figura 22). A las 72 hpi de infección se pudo observar una menor señal de apoptosis en el tratamiento OsHV-1+shARN (13%), volviendo a incrementar a las 108 (23%) y 156 hpi (26%). En organismos infectados la apoptosis disminuye conforme avanza la infección, a las 12 hpi con 37% y a las 156 hpi con 19% (Figura 22).

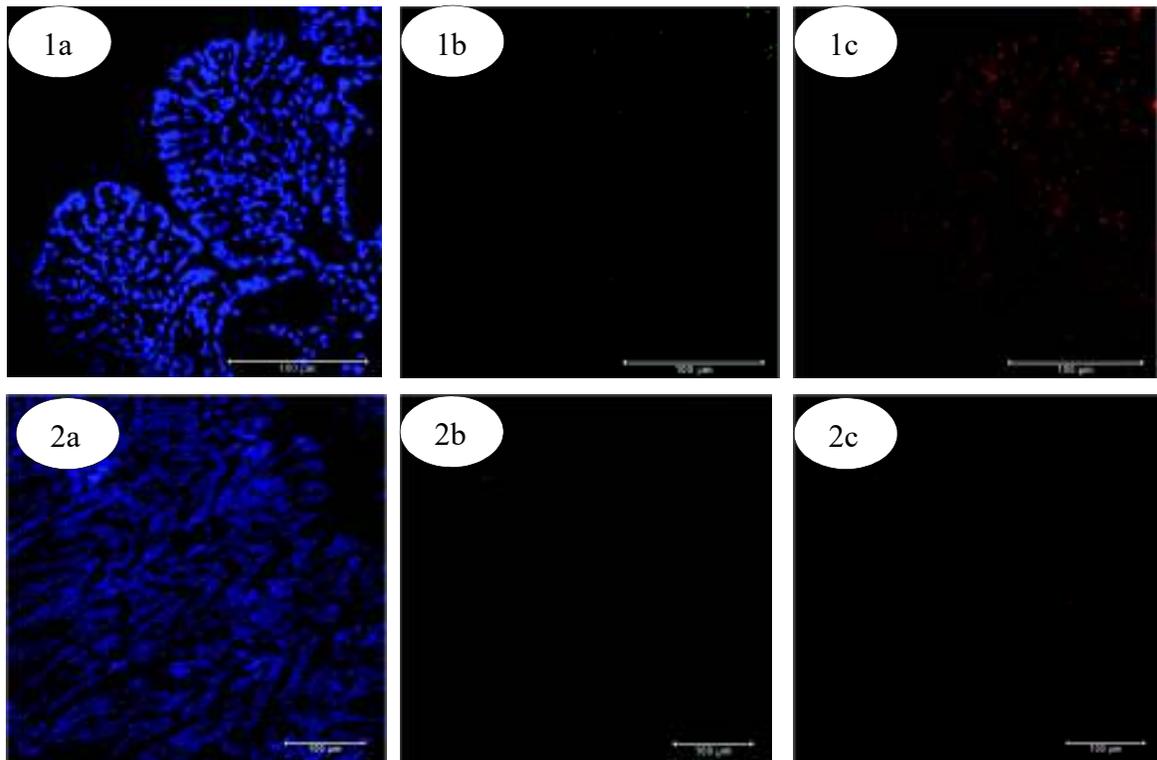


Figura 15. Ensayo de túnel del tejido de branquias de *C. gigas*. 1) Tratamiento control de organismos inyectados con solución salina 2) Tratamiento de organismos inyectados con shRNA. A) Hoechst. B) GFP. C) Alexa Fluor. Barra de escala = 100 μ m.

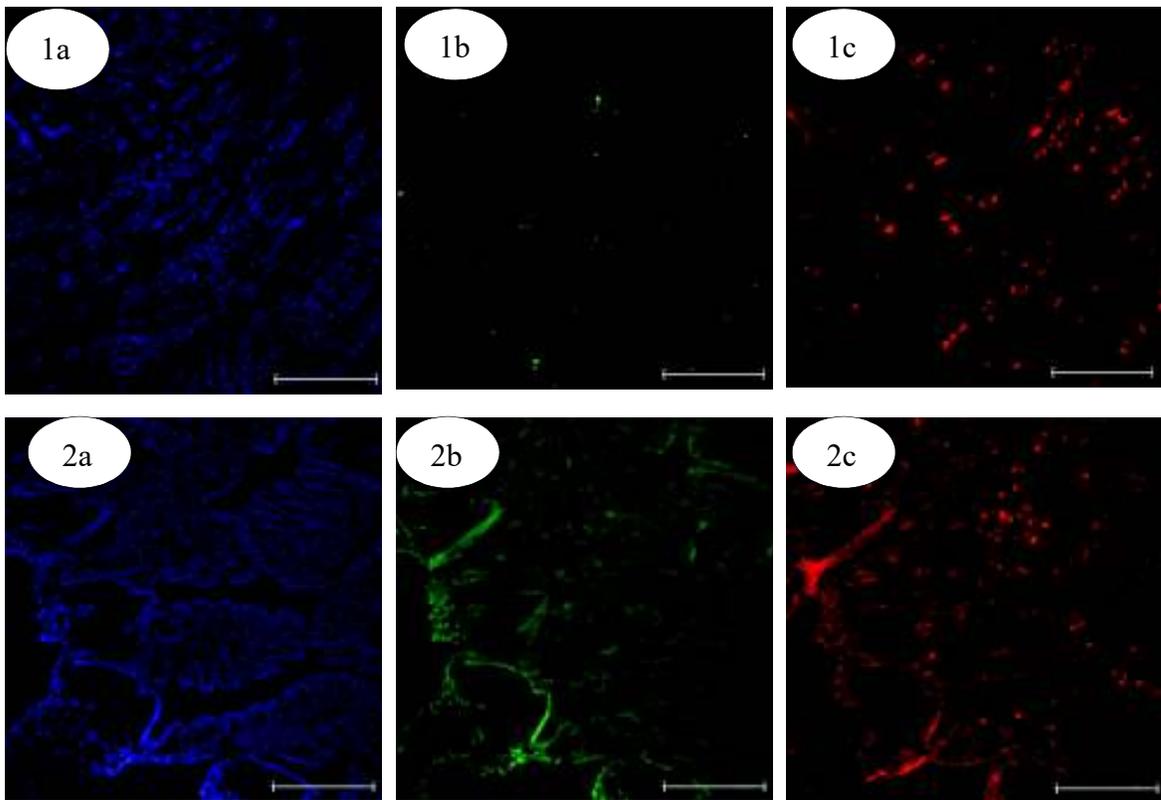


Figura 16. Ensayo de tunel del tejido de branquias de *C. gigas* a las 12 horas post infección. 1) Tratamiento de organismos infectados por OsHV-1. 2) Tratamiento de organismos infectados por OsHV-1+shRNA. A) Hoechst. B) GFP. C) Alexa Fluor. Barra de escala = 100 μm .

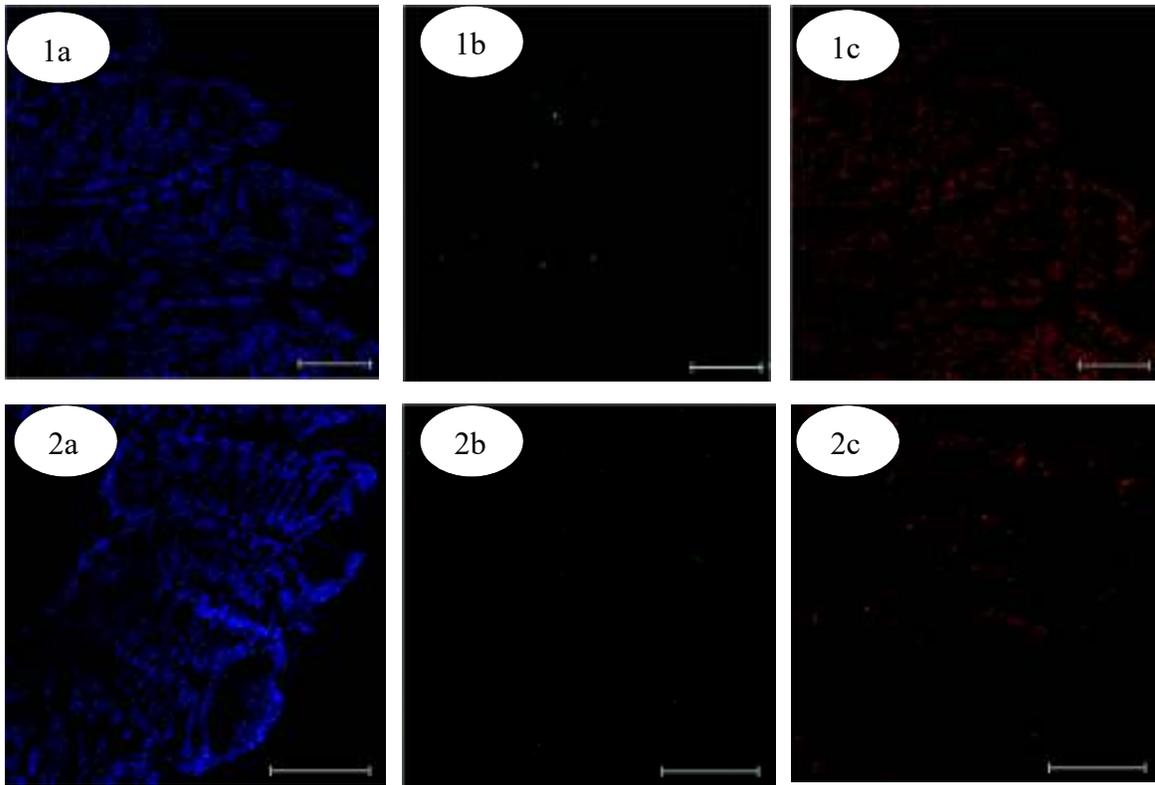


Figura 17. Ensayo de tunel del tejido de branquias de *C. gigas* a las 24 horas post infección. 1) Tratamiento de organismos infectados por OsHV-1. 2) Tratamiento de organismos infectados por OsHV-1+shRNA. A) Hoechst. B) GFP. C) Alexa Fluor. Barra de escala = 100 μ m.

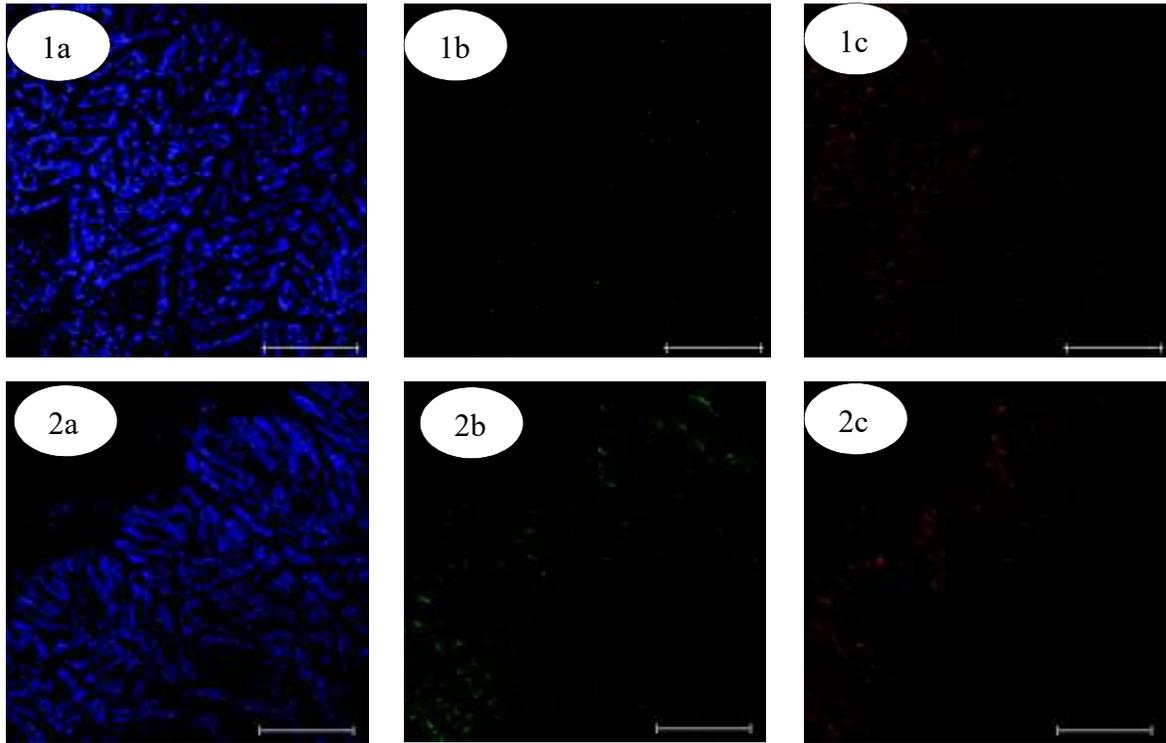


Figura 18. Ensayo de tunel del tejido de branquias de *C. gigas* a las 48 horas post infección. 1) Tratamiento de organismos infectados por OsHV-1. 2) Tratamiento de organismos infectados por OsHV-1+shRNA. A) Hoechst. B) GFP. C) Alexa Fluor. Barra de escala = 100 μ m.

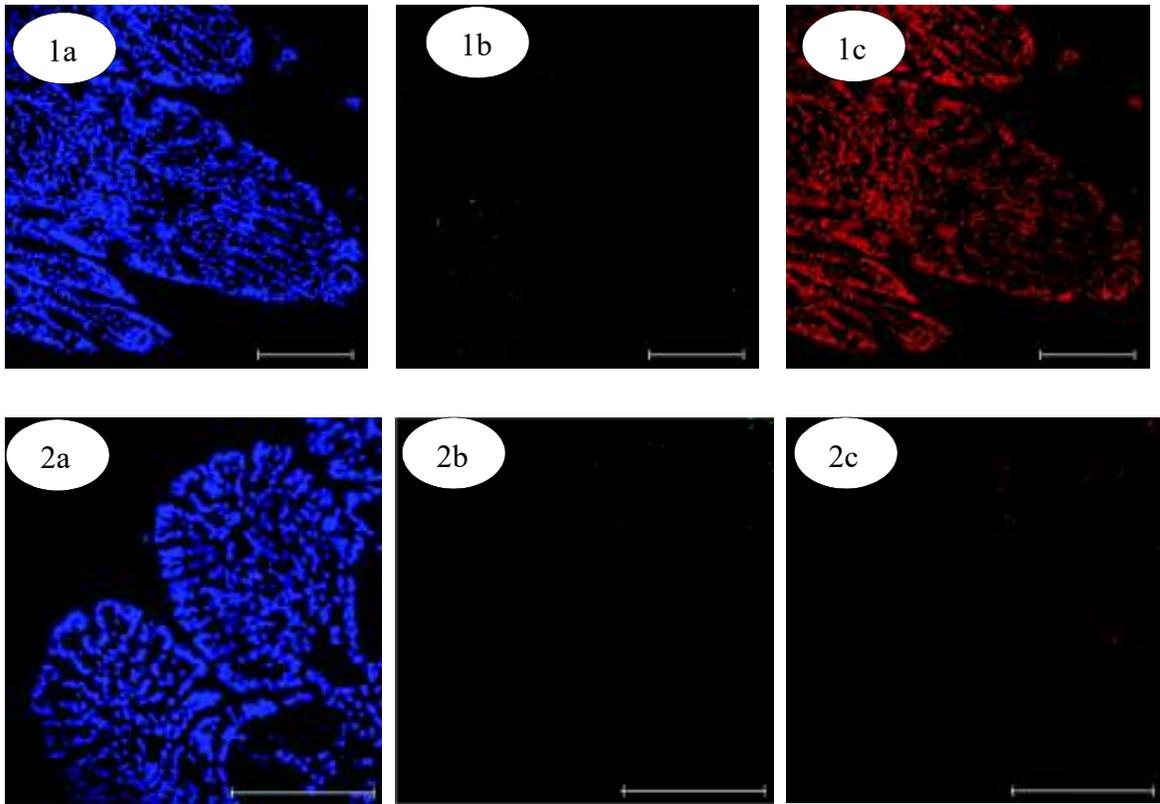


Figura 19. Ensayo de tunel del tejido de branquias de *C. gigas* a las 72 horas post infección. 1) Tratamiento de organismos infectados por OsHV-1. 2) Tratamiento de organismos infectados por OsHV-1+shRNA. A) Hoechst. B) GFP. C) Alexa Fluor. Barra de escala = 100 μm .

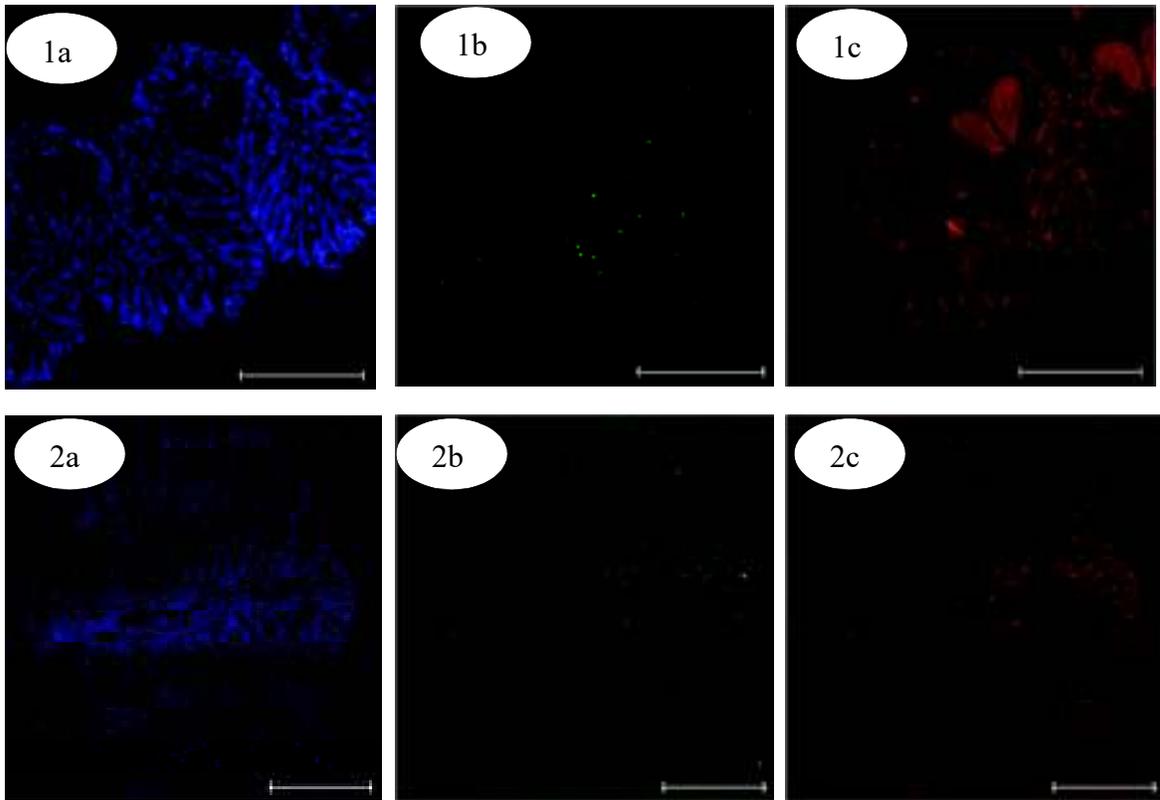


Figura 20. Ensayo de tunel del tejido de branquias de *C. gigas* a las 108 horas post infección. 1) Tratamiento de organismos infectados por OsHV-1. 2) Tratamiento de organismos infectados por OsHV-1+shRNA. A) Hoechst. B) GFP. C) Alexa Fluor. Barra de escala = 100 μ m.

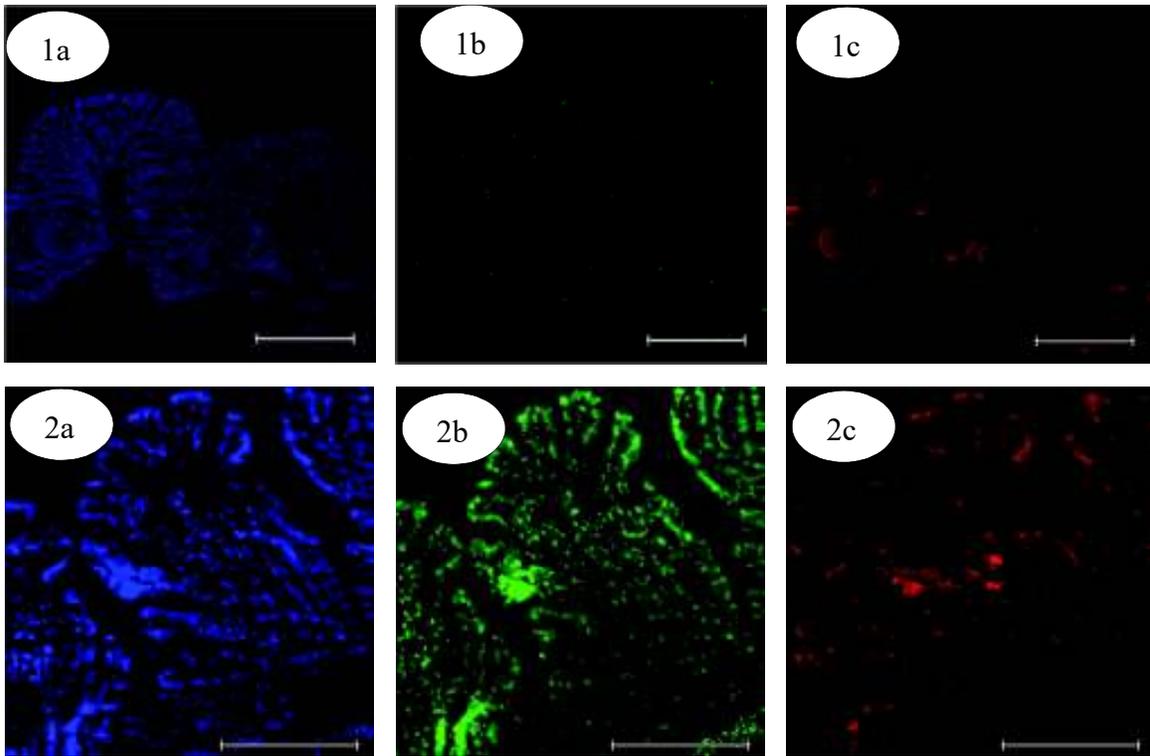


Figura 21. Ensayo de tunel del tejido de branquias de *C. gigas* a las 156 horas post infección. 1) Tratamiento de organismos infectados por OsHV-1. 2) Tratamiento de organismos infectados por OsHV-1+shRNA. A) Hoechst. B) GFP. C) Alexa Fluor. Barra de escala = 100 μm .

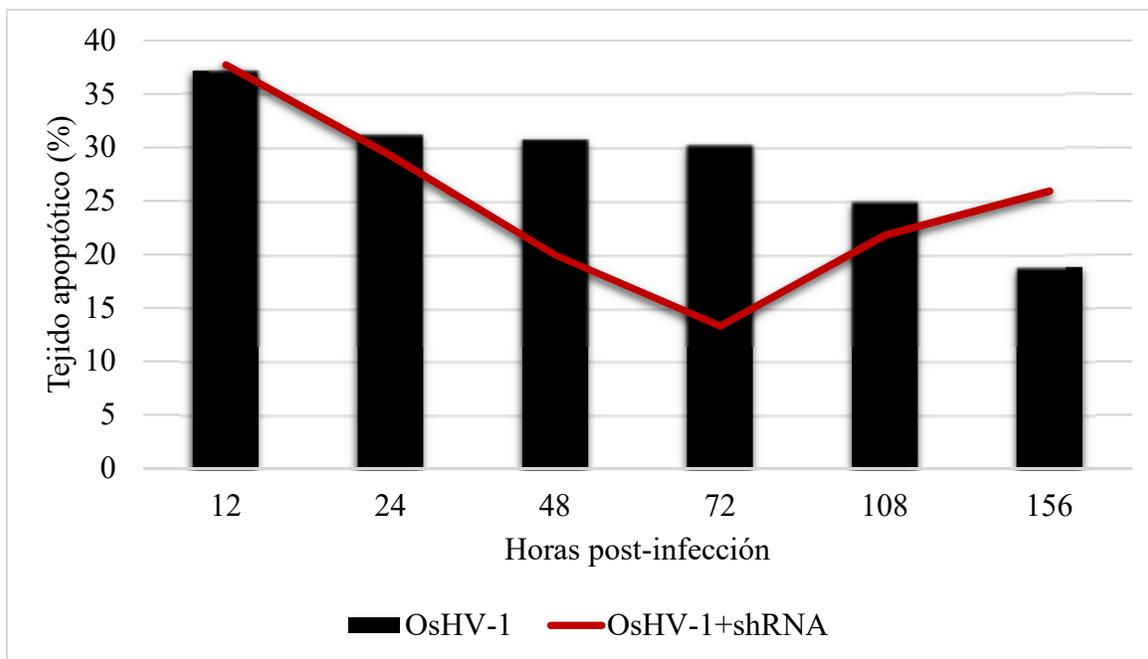


Figura 22. Gráfica porcentaje de tejido apoptótico en branquias de *Crassostrea gigas* a las diferentes horas post infección. Las barras representan el tratamiento de organismos infectados con OsHV-1. La línea roja representa el tratamiento de organismos infectados+shRNA.

V. 6. Tinción hematoxilina- eosina

En los ostiones infectados por Herpesvirus de Ostreidos 1 se observó daño en el tejido branquial, el cual presentó cambios en su estructura e inflamación, así como fusión de los ápices branquiales e infiltración hemocítica con aumento gradual de la infiltración hemocítica conforme avanzaban las horas post-infección, (Figuras de la 25A, 25B, 25C, 25D, 25E y 25F). Mientras que en los tejidos de organismos infectados+shRNA se observó daño en el tejido branquial, pero en menor medida (Figuras de la 24A, 24B, 24C, 24D, 24E y 24F) Los tejidos de los organismos sanos no presentaron daños estructurales (23A y 23B).

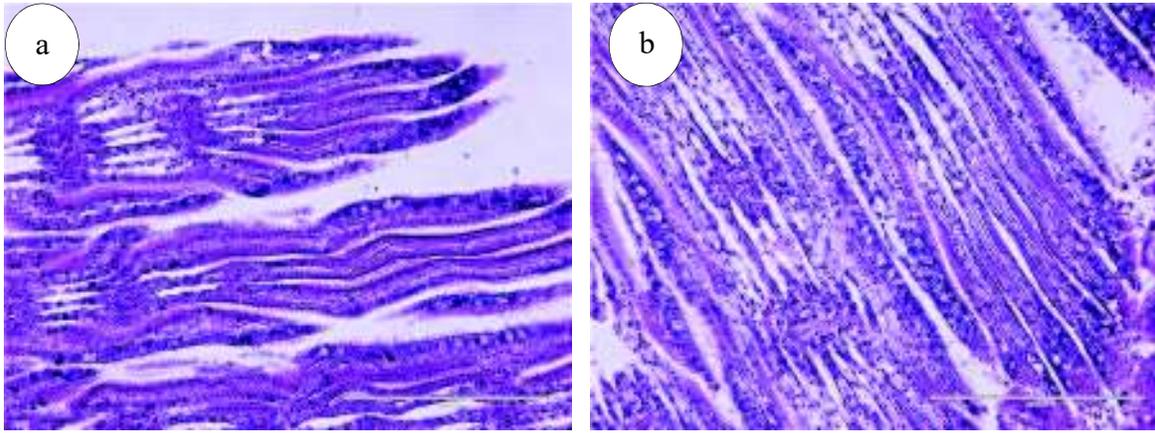


Figura 23. Cortes histológicos de las branquias de *C. gigas* (5 μm), mediante la técnica de Hematoxilina-Eosina. a) *C. gigas* inoculados con solución salina isotónica. b) *C. gigas* inyectados con shARN. (escala = 200 μm).

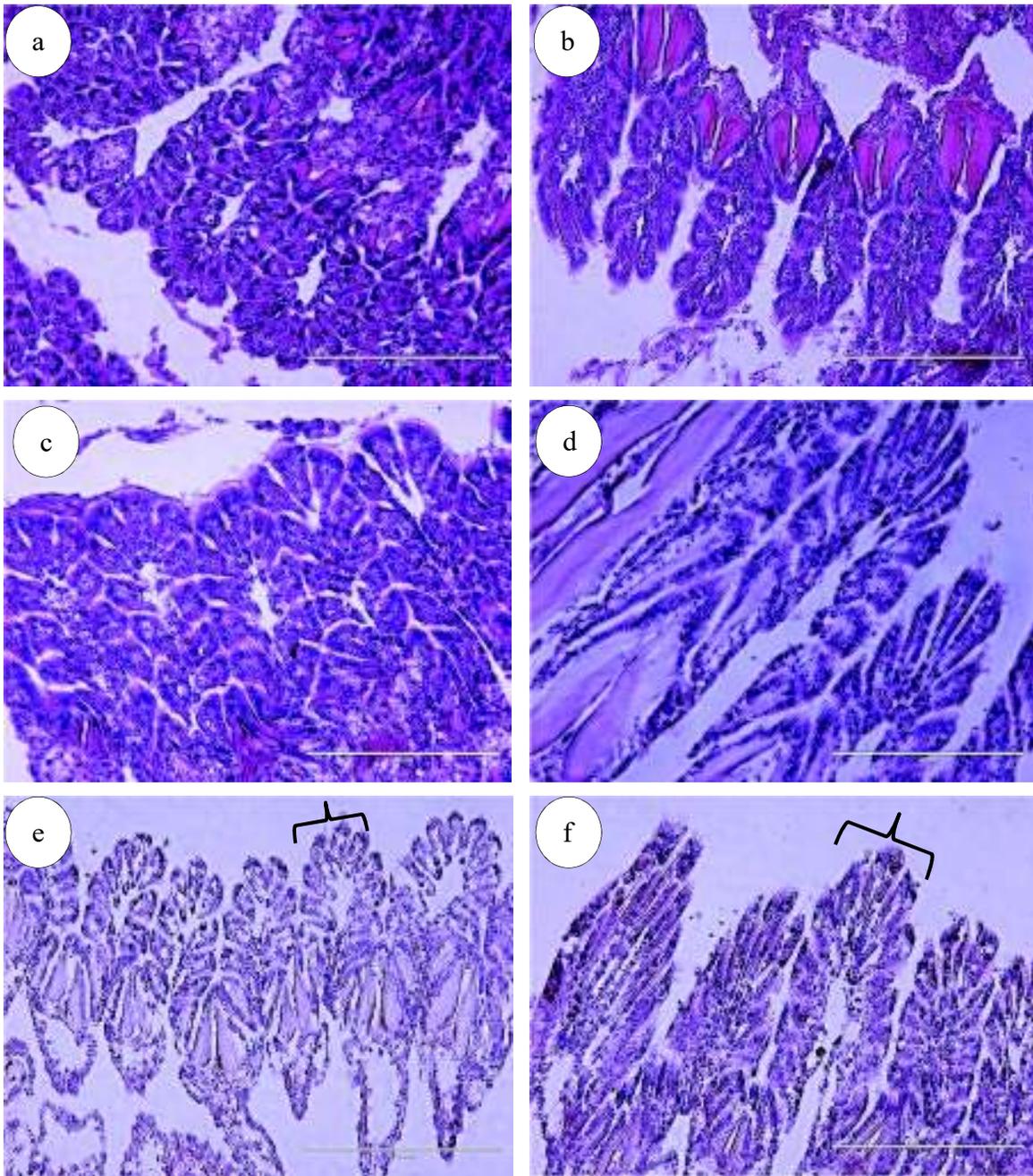


Figura 24. Cortes histológicos de las branquias de *C. gigas* (5 μ m), mediante la técnica de Hematoxilina-Eosina de las diferentes horas post infección de Herpesvirus de Ostreidos 1 e inoculados con shRNA. Branquias con pérdida de estructura, fusión de los ápices e infiltración hemocítica, los corchetes muestran los ápices fusionados de las branquias. A) 12 hpi. B) 24 hpi. C) 48 hpi. D) 72 hpi. E) 108 hpi. F) 156 hpi (escala = 200 μ m).

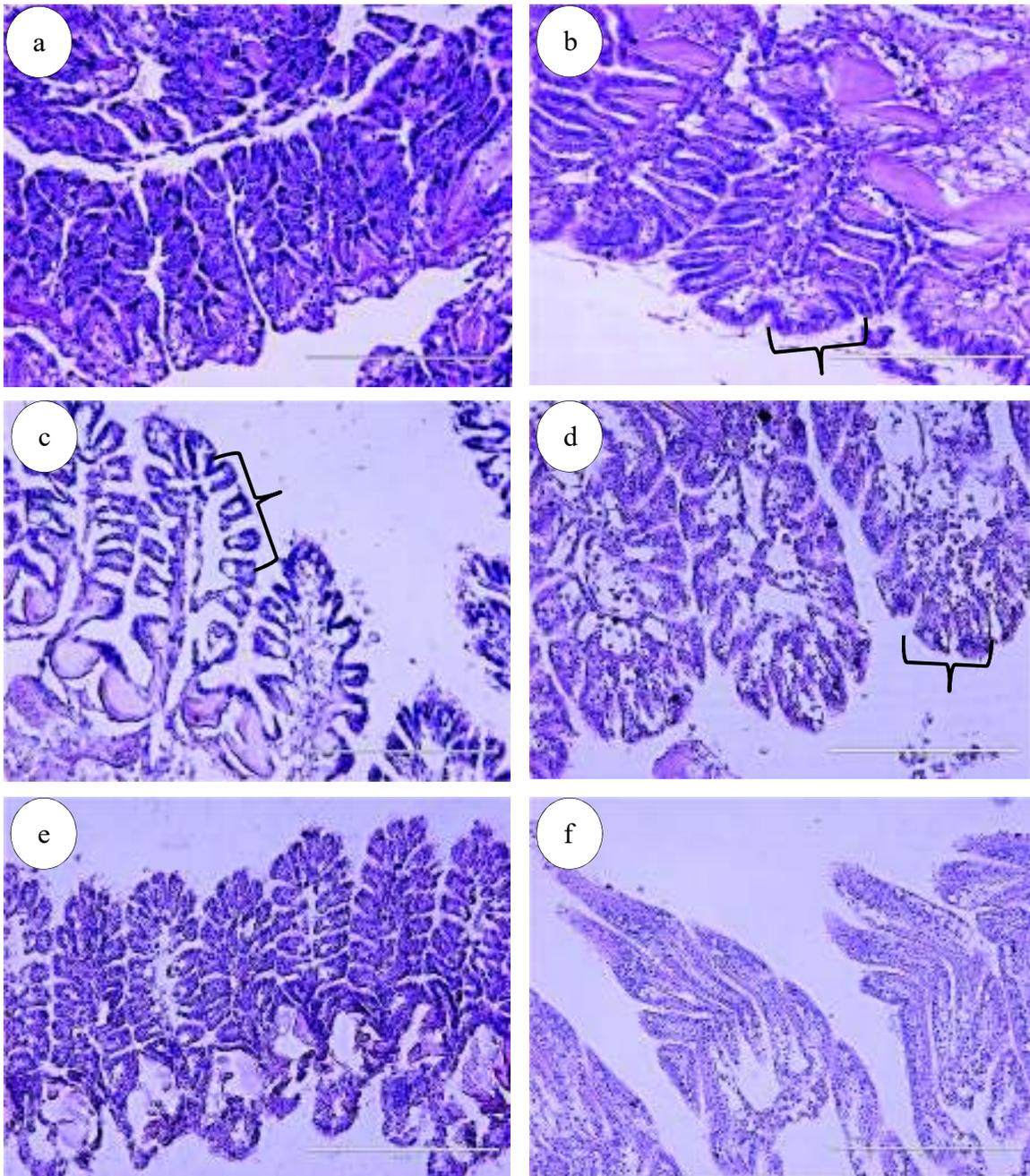


Figura 25. Cortes histológicos de las branquias de *C. gigas* ($5 \mu\text{m}$), mediante la técnica de Hematoxilina-Eosina de las diferentes horas post infección de Herpesvirus de Ostreoides 1. Branquias con pérdida de estructura, fusión de los ápices e infiltración hemocítica, los corchetes muestran los ápices fusionados de las branquias. A) 12 hpi. B) 24 hpi. C) 48 hpi. D) 72 hpi. E) 108 hpi. F) 156 hpi (escala = $100 \mu\text{m}$).

VI. DISCUSIÓN

El cultivo del ostión del pacífico es una de las prácticas más importantes en la acuicultura, debido a las altas producciones que se han obtenido y las grandes ganancias que esto genera (FAO, 2016), sin embargo, las enfermedades virales son de las principales causas de pérdidas para esta actividad (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013). Siendo el Herpesvirus de Ostreidos tipo 1 el causante de las altas mortalidades en semilla y ostiones juveniles de *C. gigas*, en diferentes regiones del mundo (Renault y Novoa, 2004; Martenot, *et al.*, 2011).

En el presente trabajo, se realizó un bioensayo de infección, en el cual se reportó mayor mortalidad en el tratamiento de organismos infectados por OsHV-1, presentando mortalidades desde las 12 hpi hasta las 108 horas. El bioensayo fue modificado a partir de Schikorski, *et al.*, 2011, el cual reportó mortalidades a las 48 hpi, siendo esta hora la que presento mayor replicación viral provocando daños severos en las células hemocíticas, lo que hizo que los organismos presentaran altas mortalidades a dicha hora. Segarra *et al.* (2014) reportan ADN viral en organismos adultos de *C. gigas* infectados experimentalmente con el OsHV-1, los cuales no presentaron mortalidad debido a la respuesta inmune del ostión, siendo menos susceptibles a la infección, porque tienen la capacidad para controlar la infección. Grijalva-Chon *et al.* (2013) encontraron el OsHV-1 en *Crassostrea gigas* adultos asintomáticos cultivados en la costa de Sonora, y sin ningún reporte de mortalidades. Siendo así, las larvas y juveniles los organismos más susceptibles a mortalidad (Green, *et al.*, 2015)

Mediante qPCR se cuantificó el gen de la ADN polimerasa del OsHV-1 en tejido de branquias, ya que según los resultados obtenidos por De La Re, *et al.*, 2017, la expresión del gen de la ADNpol es mayor en dicho tejido. Al comparar la cuantificación de la infección viral a partir del ADNg del tratamiento de ostiones infectados y ostiones infectados+shRNA, es hasta las 108 hpi, donde los niveles de infección son superiores en el tratamiento de organismos infectados por OsHV-1. Schikorski, *et al.*, 2011, por PCR en tiempo real obtuvo como mayor cantidad 1×10^5 copias/ng de ADN en manto de semillas de ostión, en el cual reporta al manto como tejido blanco del OsHV-1. Mientras que Martenot, *et al.*, 2017, observaron mayor cantidad de transcritos del virus de las 12, 24 y 48 hpi en la infección por OsHV-1 en *C. gigas*. En el presente trabajo, en la cuantificación por qPCR, a las 48 se reduce drásticamente el número de copias virales. Esto es parecido a lo observado por Green, *et al.*,

2015 reportaron, una reducción de ADN viral entre las 27 y 54 hpi de infección de OsHV-1, lo que sugiere una mediación del organismo para combatir el virus.

Mediante la técnica de tinción hematoxilina-eosina se observó una mayor degeneración de la estructura branquial, así como infiltración hemocitaria, provocada por la infección viral en el tratamiento de organismos infectados por OsHV-1. Alvarado-Arellano (2013) encontró daño en tejido de cortes histológicos de *Nodipecten subnodosus* infectado por OsHV-1, presentando leve infiltración hemocitaria en branquias, necrosis, núcleos hipertrofiados con la cromatina marginada hacia la periferia y en algunas células se presentaron cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos tipo A Cowdry. En las zonas de alta mortalidad los organismos juveniles y adultos presentaban erosiones en las branquias. Estudios recientes con microscopia electrónica de barrido (MET), hibridación *in situ* y análisis histológico confirman la presencia del OsHV-1 en organismos con erosión branquial (Vásquez-Yeomans *et al.*, 2010; De La Re, *et al.*, 2017). En juveniles de *C. gigas* infectados por OsHV-1 se observa una degeneración hemocítica, caracterizada por una fragmentación y picnosis nuclear (Friedman *et al.*, 2005).

En los moluscos las células sanguíneas son conocidas como hemocitos, las cuales interactúan con partículas externas que entran al sistema del organismo, y subsecuentemente activan diferentes vías de respuesta como la fagocitosis, apoptosis, encapsulación, entre otras (Wang, *et al.*, 2017). Siendo la apoptosis un proceso de muerte celular programada que se lleva a cabo por la familia cisteín-proteasas conocidas como caspasas (Elmore, 2007). Donde existen diferentes proteínas, como las homologas a las IκB quinasas (Cg-IκB1 y Cg-IκB2) están involucradas en la defensa de moluscos y se ha observado que no tienen un patrón de expresión idéntico, y su sobreexpresión durante infecciones por patógenos probablemente esté involucrada en la disminución de expresión de NF-κB, el cual es un factor nuclear que juega un papel importante en la respuesta inmune de invertebrados, siendo este un mecanismo para mantener el equilibrio entre la protección del huésped y la eliminación de patógenos en el ostión (Zhang, *et al.*, 2011). También la proteína CgTNF-1 tiene un dominio de las TNF (factor de necrosis tumoral), las sCgTNF-1 regulan la apoptosis y fagocitosis en hemocitos, así como los mecanismos PO, las lisozimas y actividades antibacterianas (Whang, *et al.*, 2017).

Segarra, *et al.*, 2014 observaron una sobreexpresión de los genes IAP (inhibidores de la apoptosis) durante la infección por OsHV-1, la cual puede ser resultado de la infección por el virus. Pauletto, *et al.*, 2017, en organismos infectados con OsHV-1 mostraron una alta activación de Cg-IAP, sugiriendo la inhibición de la apoptosis, lo cual trae como consecuencia la dispersión del virus. Martenot, *et al.*, 2017, detectaron una baja regulación de las proteínas involucradas en la activación de la apoptosis (TNF y caspasa 3), mientras que se tuvo un incremento de la expresión de los genes que codifican proteínas anti-apoptosis (IAP-2 y Bcl-2) en hemocitos de ostiones infectados por OsHV-1 a las 24 y 48 hpi. Por otra parte, el α -herpesvirus puede codificar proteínas antiapoptóticas, como US3, gJ y LAT, para interferir con la apoptosis, y evadir su eliminación (You, *et al.*, 2017). Además, mediante la actividad de proteína ribonucleótido reductasa en infecciones por Virus del Herpes simple (HSV-1 y HSV-2) se muestra una protección de las células contra la apoptosis, mediante la interacción de los receptores de la caspasa 8, interfiriendo en el progreso de la apoptosis celular (Dufour, *et al.*, 2010).

En el presente estudio se observó la apoptosis celular mediante la técnica de túnel en tejidos de branquias del ostión del Pacífico, durante la infección por OsHV-1, donde el tejido apoptótico permaneció constante, sin embargo, las células apoptóticas disminuyeron a las 108, lo cual puede ser atribuido a la infección por OsHV-1, donde el organismo presentaba mayor número de copias virales, pero a las 156 hpi la apoptosis disminuye al igual que la infección, por lo cual es importante señalar la capacidad de los ostiones para inhibir y controlar el proceso de apoptosis, siendo este esencial para la supervivencia del organismo. Es por esto que el estudio de los genes implicados en la apoptosis durante las infecciones virales es de gran importancia.

Por otra parte, los receptores toll-like (TLRs), receptores RIG-I, sintasa cíclica GMP-AMP (cGAS) y proteínas DICER se han identificado en moluscos y están potencialmente involucradas en el reconocimiento de virus. Donde los TLR3, que unen los dsRNA, promoviendo una compleja vía de señalización, resultando la traslocación de NF- κ B e IRF al núcleo celular, regulando la expresión de genes que forman los interferones (Randall & Goodbourn, 2008). Estos interferones producen respuestas antivirales mediadas por las proteínas quinasas R (PKR), es por esto que Robalino, *et al.*, 2004, observó una respuesta

antiviral en *L. vannamei* mediante la inyección de dsRNA, mediando la interferencia de genes. Pauletto, *et al.*, 2017, mediante la inyección de dsRNA dirigidos a Cg-IkB2 durante la infección de OsHV-1 en *C. gigas*, observó una supervivencia cercana al 100% y un bajo número de copias de genes virales.

Hoy en día se han desarrollado metodologías dirigidas a la reducción o control de la infección de diversos virus en organismos de interés acuícola. En las últimas décadas, el silenciamiento de genes por RNAi es una técnica prometedora para el tratamiento viral en diversos organismos (Reshi, *et al.*, 2014). Escobedo-Bonilla, *et al.*, 2014, observaron respuesta antiviral mediante tratamiento con dsRNA dirigido a genes de proteínas capsídicas del virus de la mancha blanca (WSSV) en *Litopenaeus vannamei*, donde observaron una reducción de las mortalidades (10%). En el presente trabajo se vio una reducción en la mortalidad de los organismos infectados por OsHV-1+shRNA, con un 90% de supervivencia.

En el tratamiento de organismos infectados+shARN se observa una reducción del número de copias a las 72 y 108 hpi, de ~3 y ~98 veces respectivamente. Pero se observa un aumento a las 156 hpi de ~895 veces comparado con el tratamiento de organismos infectados. El silenciamiento de genes por RNAi se ha probado en virus que infectan al camarón, tal es el caso de Tirasophon, *et al.*, 2007 observaron una disminución de la carga viral a las 3, 6 y 12 hpi en los organismos inyectados con dsRNA dirigido a proteasas del virus de la cabeza amarilla. Xu, *et al.*, 2007, mediante siRNA obtuvo un silenciamiento de la transcripción y expresión del gen vp28 del WSSV en *P. japonicum*, además disminuyó significativamente la mortalidad. Para el caso del ostión del pacífico, Pauletto, *et al.*, 2017, mediante la inyección de dsRNAs dirigidos a Cg-IkB2 durante la infección de OsHV-1 en *C. gigas*, observó una supervivencia cercana al 100% y un bajo número de copias de genes virales. Sarathi, *et al.*, 2008, menciona que el uso de vectores bacterianos y dsRNA dirigido a proteínas virales (VP24, VP19 y VP15) actúa como una técnica efectiva contra el WSSV en *P. monodon*.

Dentro del ARN de interferencia, están los shRNA, Lamberth y Smith en el 2013, afirman que el uso de shRNA ofrece una mayor efectividad en el silenciamiento en comparación con los siRNAs, ya que los shRNA se pueden clonar en vectores de expresión los cuales contienen marcadores de selección de antibióticos y una mayor especificidad por el tipo de célula ya que algunos vectores poseen en su genoma cassettes de virus que los hacen

más específicos; por lo que propician un silenciamiento prolongado de proteínas o supresión del ARN mensajero al que fueron dirigidos. Brake, *et al.*, 2008, mediante shARN en vectores de expresión de lentivirus inhibieron la replicación de VIH-1 (virus de inmunodeficiencia humana 1) en células T. Clarke, *et al.*, 2017, inhibieron la replicación del virus hemorrágico septicémico en células del pez cebra, donde utilizaron shARN en vectores de expresión dirigidos a glicoproteínas virales y ADN polimerasas, siendo más eficientes en cuestión de reducción de la infección los shARNs dirigidos a glicoproteínas.

A pesar de los estudios realizados sobre silenciamiento de genes en especies de interés acuícola, es importante implementar metodologías para la administración continua del RNA de interferencia. Por esta razón varios estudios se enfocan en esta temática, tal es el caso en donde Witteveldt, *et al.*, en el 2004, alimentaron a *P. monodon* con alimento recubierto de bacterias inactivadas con una sobreexpresión de la VP28 y, los camarones mostraron mejores tasas de supervivencia tras la exposición al WSSV. Sin embargo, la protección solo fue eficaz cuando los camarones estaban infectados con dosis bajas del virus y solía durar solo unos pocos días. También para el tratamiento del virus de cabeza amarilla en *L. vannamei*, se han utilizado microalgas como la *Chlamydomonas reinhardtii* con cloroplastos diseñados para la expresión de dsARN dirigido a YSV, las cuales fungieron como alimento y antiviral, proporcionando un 50% de supervivencia hasta los 8 días de infección, donde los organismos infectados posteriormente presentaron un 84% de mortalidad (Charoonart, *et al.*, 2019). Siendo esto un resultado prometedor, en la utilización de las microalgas como una alternativa novedosa, proporcionando alimento y tratamiento antiviral en la acuicultura del camarón.

VII. CONCLUSIONES

En el presente trabajo fue posible sintetizar un shRNA dirigido a la ADN polimerasa del OsHV-1 en un vector de expresión con un cassette de especificidad a un parvovirus.

Se observó por PCR en tiempo real una reducción del número de copias virales para el tratamiento de ostiones infectados + shRNA, lo que sugiere un silenciamiento del gen que codifica para la ADN polimerasa viral lo que da como resultado una disminución de la infección. A las 72 hpi se observó una disminución de la apoptosis y un menor número de copias virales en el tratamiento de organismos infectados + shRNA. Sugiriendo que el organismo está mediando la defensa contra la infección en conjunto con el silenciamiento el cual puede estar perdiendo efectividad, por lo cual se recomienda una reinoculación del shRNA.

Al igual que trabajos anteriores, en el presente estudio se pudo observar que durante la infección por OsHV-1 los tejidos mayormente afectados son las branquias, debido a su alta tasa de replicación celular.

Es importante mencionar que este es el primer trabajo utilizando un shRNA dirigido a una proteína del OsHV-1 involucrada en la replicación del ADN, en el cual se pudo observar una supervivencia alta, lo que da una expectativa a futuro prometedora, para el uso de este tipo de metodología en la ostricultura.

VIII. RECOMENDACIONES

Se recomienda verificar el efecto de diferentes concentraciones del shRNA en el proceso de infección, con la finalidad de observar diferencias en el silenciamiento del OsHV-1. Además, realizar estudios para incrementar la estabilidad del shRNA y tener un silenciamiento prolongado.

El utilizar organismos juveniles, así como semillas de ostión para bioensayos de infección y silenciamiento, también es importante para medir el efecto en diferentes etapas de desarrollo del ostión.

Es importante el dirigir el silenciamiento a otros genes implicados en la replicación viral, proteínas capsídicas, y verificar su efectividad, así como el estudio de expresión de los genes implicados en el proceso de defensa del ostión, incluyendo la apoptosis celular.

También es indispensable el estudio de microalgas recombinantes con RNAi dirigido a genes virales, las cuales pueden servir de alimento y de antiviral, pudiendo reducir la infección de OsHV-1.

IX. LITERATURA CITADA

- Aigner, A. 2006. Delivery systems for the direct application of siRNAs to induce RNA interference (RNAi) in vivo. *BioMed Research International* 2006:1-15.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller y D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402.
- Alvarado-Arellano, A. 2013. Estudio sobre la diversidad genética del Herpesvirus de los ostreidos-1. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, Baja California Sur, México.
- Arzul, I., T. Renault, C. Lipart y D. J. Andrew. 2001. Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *Journal of General Virology* 82:865–870.
- Ben-Horin, T., G. Bidegain, L. Huey, D. A. Nevarez y D. Bushek. 2015. Parasite transmission through suspension feeding. *Journal of Invertebrate Pathology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.006>
- Brake, O., K. Hotft, Y. P. Liu, M. Centlivre, K. J. Elije y B. Berkhout. 2008. Lentiviral vector design for multiple shRNA expression and durable HIV-1 inhibition. *Molecular Therapy*. 16: 557-564. 10.1038/sj.mt.6300382
- Brown, T. 2008. *Genomas*. Ed. Médica Panamericana. 3a Edición. Buenos Aires, Argentina. Pág. 290
- Burzynski, S. R. 2006. Age Management Treatments wick Target Silenced Genes Pág 34-41. En: Redberry, G. W. 2006. *Gene Silencing: New research*. Nova Science Publishers, Inc. New York.
- Cáceres-Martínez, J. y R. Vásques-Yeomans. 2013. Uso de la técnica de PCR en el proceso de diagnóstico de enfermedades infecciosas en organismos acuáticos, su validación y su interpretación. *Ciencia Pesquera* 21:57-65.
- Cáceres-Martínez, J. y R. Vásques-Yeomans. 2013. Uso de la técnica de PCR en el proceso de diagnóstico de enfermedades infecciosas en organismos acuáticos, su validación y su interpretación. *Ciencia Pesquera* 21:57-65.
- Charoonnart, P. N. Worakajit, J. A. Zedler, M. Meetam, C. Robinson y V. Saksmerprome. 2019. Generation of microalga *Chlamydomonas reinhardtii* expressing shrimp antiviral dsRNA without supplementation of antibiotics. *Nature*. 9: 3164. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39539-x>
- Chávez-Villalba, J. 2014. Cultivo de ostión *Crassostrea gigas*: Análisis de 40 años de actividades en México. *Hidrobiológica* 24:175-190

- Clarke, B. D., K. A. McColl, A. C. Ward y T. J. Doran. 2017. shRNAs targeting either the glycoprotein or polymerase genes inhibit Viral haemorrhagic septicaemia virus replication in zebrafish ZF4 cells. *Antiviral Research*. 141: 124-132. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.02.012>
- Davison, A. J., R. Eberle, B. Ehlers, G. S. Hayward, D. J. McGeoch, A. C. Minson, P. E. Pellett, B. Roizman, M. J. Studdert y E. Thiry. 2009. The order herpesvirales. *Archives of Virology* 154:171-177.
- Davison, A. J., Trus, B. L., Cheng, N., Steven, A. C., Watson, M. S., Cunningham, C., Le Deuff, R.-M. y Renault, T. 2005. A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *Journal of General Virology* 86:41-53. Apellidos
- De La Re-Vega, E., A. Sánchez- Paz, C. Gallardo-Ybarra, M. A. Lastra-Encinas, R. Castro-Longoria, J. M. Grijalva-Chon, M. A. López-Torres y A. D. Maldonado-Arce. 2017. The Pacific oyster (*Crassostrea giga*) Hsp70 modulates the Ostreid herpes virus 1 infectivity. *Fish & Shellfish Immunology*. 71: 127-135.
- Dégremont, L., T. Guyader, D. Tourbiez y J. F. Pépin. 2013. Is horizontal transmission of the Ostreid herpesvirus OsHV-1 in *Crassostrea gigas* affected by unselected or selected survival status in adults to juveniles? *Aquaculture* 408: 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.05.025>
- Dufour, F., A. Sasseville y S. Chabaud. 2010. The ribonucleotide reductase R1 subunits of herpes simplex virus types 1 and 2 protect cells against TNF α - and FasL- induced apoptosis by interacting with caspase-8. *Apoptosis*. 16: 256-271
- Dykxhoorn, D. M., C. D. Novina, y P. A. Sharp. 2003. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nature Reviews Molecular. Cell Biology*, 4: 457–467. doi:10.1038/nrm1129
- Dykxhoorn, D. M., y J. Lieberman. 2005. The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic. *Annual Review of Medicine* 56:401-423.
- Dykxhoorn, D. M., y J. Lieberman. 2006. Silencing Viral Infection. *PLoS MED*; 3 (7): 1000-1004. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030242
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 35: 495-516.
- Enriquez-Espinoza, T., J. M. Grijalva-Chon, R. Castro-Longoria, J. Ramos-Paredes. 2010. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. *Diseases of Aquatic Organisms* 89:269-273.
- Escobedo-Bonilla, C. M., S. Vega-Peña, C. H. Mejía-Ruiz. 2014. Efficacy of double-stranded RNA against white spot syndrome virus (WSSV) non-structural (orf89,

- wsw191) and structural (vp28, vp26) genes in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of King Saud University-Science. 27: 182-188.
- Escobedo-Fregoso, C., I. Arzul, N. Carrasco, J. N. Gutiérrez-Rivera, R. Llera-Herrera y R. Vázquez-Juárez. 2013. Polymorphism at the ITS and NTS Loci of *Perkinsus marinus* Isolated from Cultivated Oyster *Crassostrea corteziensis* in Nayarit, Mexico and Phylogentic Relationship to *P. marinus* along the Atlantic Coast. Transboundary and emerging diseases. 62: 137-147.
- Fabioux, C., C. Corporeau, V. Quillien, P. Favrel y A. Huvet. 2009. In vivo RNA interference in oyster -*vasa* silencing inhibits germ cell development. The FEBS Journal 276:2566-2573.
- FAO. 2014. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2014. Roma.
- FAO. 2015. Global Aquaculture Production statistics database updated to 2013. Roma: FAO. <http://www.fao.org/3/a-i4899e.pdf>
- FAO. 2016. Departamento de Pesca y Agricultura. Obtenido de Programa de información de especies acuáticas: *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793): http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/es.
- FAO. 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma.
- Friedman, C. S., R. M. Estes, N. A. Stokes, C. A. Burge, J. S. Hargove, B. J. Barber, R. A. Elston, E. M. Bureson y K. S. Reece. 2005. Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. Diseases of Aquatic Organisms 63:33–41.
- Gitlin L., S. Karelsky y R. Andino. 2002. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. Nature. 418: 430-434. 10.1038/nature00873.
- Green, T. J., J. L. Rolland, A. Vergnes, D. Raftos y C. Montagnani. 2015. OsHV-1 countermeasures to the Pacific oyster's anti-viral response. Fish & Shellfish Immunology. 47: 435-443. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.09.025>
- Grijalva-Chon, J. M., R. Castro-Longoria, J. Ramos-Paredes, T. L. Enríquez-Espinoza y F. Mendoza-Cano. 2013. Detection of a new OsHV-1 DNA strain in the healthy Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg, from the Gulf of California. Journal of Fish Diseases 36:965-968.
- Grijalva-Chon, J. M., R. Castro-Longoria, T. L. Enriquez-Espinoza, A. N. Maeda-Martinez y F. Mendoza-Cano. 2015. Molecular evidence of the protozoan parasite *Marteilia refringens* in *Crassostrea gigas* and *Crassostrea corteziensis* from the Gulf of California. Latin American Journal of Aquatic Research 43:776-780

- Helm, M. M., N. Bourne y A. Lovatelli. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. FAO Documento Técnico de Pesca 471. Roma, FAO.
- Huvet, A., E. Fleury, C. Corporeau, V. Quillien, J. Y. Daniel, G. Riviere, P. Boudry y C. Fabioux. 2012. In vivo RNA interference of a gonad-specific transforming growth factor- β in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biotechnology* 14:402-410.
- Jiang, X., Z. Kalajzic, P. Maye, A. Braut, J. Bellizzi, M. Mina y D. W. Rowe. 2005. Histological analysis of GFP expression in murine bone. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 53:593-602.
- Karp, G. C. 2014. RNA reguladores pequeños y vías de desactivación de ARN. Págs: 455-461. *Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos.* McGrawHill. 7ª Edición. Pag. 455-458
- Kim, M. S. y K. H. Kim. 2011. Inhibition of viral hemorrhagic septicemia virus replication using a short hairpin RNA targeting the G gene. *Archives of Virology* 156:457-464.
- Kim, M. S. y K. M. Kim. 2011. Inhibition of viral hemorrhagic septicemia virus replication using a short hairpin RNA targeting the G gene. *Archives of Virology* 156:457-464.
- Lambeth, L. S. y C. A. Smith. 2013. Short hairpin RNA-mediated gene silencing. In: Taxman D. (eds) *siRNA Design. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* 942: 205-232. Humana Press, Totowa, NJ.
- Lewin, B. 2008. *Genes IX.* McGraw Hill. México Pag. 2-11, 428.
- Livak, K. J y T. D Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta (CT)) method. *Methods* 25:402-408.
- López, T., D. Silva, S. López y C. Arias. 2007. RNA de interferencia el silencio de los genes. *Biotecnología.* Volumen 14. http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_10.pdf
- Lorenzo P., A. Moreno, I. Lizasoain, J. C. Leza, M. A. Moro y A. Portolés. 2008. *Velázquez Farmacología Básica y Clínica.* Editorial Médica Panamericana. 18ª Edición. España. Pág. 804.
- Maeda-Martínez, A. N. 2008. Estado actual del cultivo de bivalvos en México. 91–100 p. En: Lovatelli, A., A. Farías e I. Uriarte. (eds.), *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina.* Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. Roma.
- Martenot, C., E. Oden, E. Travaillé, J. P. Malas y M. Houssin. 2011. Detection of different variants of Ostreid Herpesvirus 1 in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* between 2008 and 2010. *Virus Research* 160:25-31.

- Martenot, C., O. Gervais, B. Chollet. M. Houssin y T. Renault. 2017. Haemocytes collected from experimentally infected Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: Detection of ostreid herpesvirus 1 DNA, RNA, and proteins in relation with inhibition of apoptosis. PLoS ONE. 12: e0177448. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177448>
- Martínez-García, M. F., J. M. Grijalva-Chon, R. Castro-Longoria, J. E. Chávez-Villalba, T. L. Enríquez-Espinoza, A. N. Maeda-Martínez, E. Peña-Messina. 2011. OsHV-1 and notifiable protozoa in healthy *Crassostrea corteziensis* cultured in two distant areas of the Gulf of California. Latin American Journal of Aquatic Research. 45: 699-707. 10.3856/vol45-issue4-fulltext-6
- Martínez-Porchas, M. y L. R. Martínez- Córdova. 2012. World Aquaculture: Environmental Impacts and Troubleshooting Alternatives. Scientific World Journal 2012:1-9.
- McIntyre, G. J. y G. C. Fanning. 2006. Design and cloning strategies for constructing shRNA expression vectors. BMC Biotechnology 6: 1.
- Mendoza-Cano, F. y A. Sanchez-Paz. 2013. Development and validation of a quantitative real-time polymerase chain assay for universal detection of the White Spot Syndrome Virus in marine crustaceans. Virology Journal 10:186.
- Metzlaff, M., M. O'Dell, P. D. Cluster y R. B. Flavell. 1997. RNA-Mediated RNA Degradation and Chalcone Synthase A Silencing in Petunia. Cell 88: 845-854.
- Mocellin, S. y M. Provenzano. 2004. RNA interference: learning gene knock-down from cell physiology. Journal of Translational Medicine 2:39.
- Moore, C. B., E. Guthrie, M. T. Huang y D. J. Taxman. 2010. Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. Methods in Molecular Biology 629: 141-158.
- Müller-Esterl, W. 2008. Bioquímica: fundamentos para medicina y ciencias de la vida. Editorial: Reverté Edición: 2ª. España. Pág. 207
- Nakagawa, A., K. Von-Alt, K. D. Lillemoe, C. Fernandez-del Castillo, A. L. Warshaw y A. S. Liss. 2015. A method for fixing and paraffin embedding tissue to retain the natural fluorescence of reporter proteins. BioTechniques 58:153-155.
- Nehring, S. 2011. Invasive Alien Species Fact Sheet – *Crassostrea gigas*. Online Database of the European Network on Invasive Alien Species - NOBANIS. www.nobanis.org
- OIE. 2015. Manual de las Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos. Organización Mundial de Sanidad Animal. Paris.
- Orengo-Ferriz, D. J. 2011. Fundamentos de biología molecular. Editorial UOC. 1ª Edición. Barcelona. Pág. 85-88.

- Ortiz-Quintero B. 2009. RNA de interferencia: Origen y aplicación en el silenciamiento de genes. *Rev Invest Clin.* 61: 412-427.
- Paddison, P. J., A. A. Caudy, E. Bernstein, G. J. Hannon y D. S. Conkin. 2002. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes & Development* 16:948-958.
- Park, B. H., M. S. Park, B. Kim, S. B. Hur y S. J. Kim. 1988. Culture of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) in the Republic of Korea. FAO. Republic of Korea. <http://www.fao.org/3/ab706e/AB706E00.htm#TOC>
- Pauletto, M., A. Segarra, C. Montagnani, V. Quillien, N. Faury, J. Le-Grand, P. Miner, B. Petton, Y. Labreuche, E. Fleury, C. Fabioux, L. Bargelloni, T. Renault, A. Huvet. 2017. Long dsRNAs promote an anti-viral response in Pacific oyster hampering ostreid herpesvirus 1 replication. *J Exp Biol.* 15: 3671-3685. doi: 10.1242/jeb.156299
- Pernet, F., D. Tamayo y B. Petton. 2015. Influence of low temperature on the survival of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) infected with Ostreid herpes virus type 1. *Aquaculture* 445: 57–62. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2015.04.010
- Pernet, F., J. Barret, P. Le Gall, C. Corporeau, L. Dégremont, F. Lagarde, J. F. Pepin y N. Keck. 2012. Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon, France. *Aquacult. Environ. Interact.* 2: 215–237. DOI: 10.3354/aei00041.
- Petton, B., F. Pernet, R. Robert y P. Boudry. 2013. Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquac. Environ. Interact.* 3: 257–273. DOI: 10.3354/aei00070
- Pierce, B. A. 2009. *Genética: un enfoque conceptual*. Ed. Médica Panamericana. 3ª Edición. Madrid, España. Pág. 454-455
- Randall, R.E y S. Goodbourn, S. 2008. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and viral countermeasures. *J. Gen. Virol.* 89: 1-47.
- Renault, T. y B. Novoa. 2004. Viruses infecting bivalve molluscs. *Aquatic Living Resources* 17:397-409.
- Renault, T., A. L. Bouquet, J. T. Maurice, C. Lupo, y P. Blachier. 2014. Ostreid herpesvirus 1 Infection among Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat: relevance of water temperature to virus replication and circulation prior to the onset of mortality. *Appl. Environ. Microbiol.* 80: 5419–5426. DOI:10.1128/AEM.00484-14
- Renault, T., P. Moreau, N. Faury, J. F. Pepin, A. Segarra y S. Webb. 2012. Analysis of clinical ostreid herpesvirus 1 (Malacoherpesviridae) specimens by sequencing amplified fragments from three virus genome areas. *Journal of Virology* 86:5942-5947.

- Reshi, M. L., J. L. Wu, H. V. Wang y J. R. Hong. 2014. RNA interference technology for the study of aquatic virus infections. *Fish & Shellfish Immunology*. 40: 14-23.
- Robalino, J., C. L. Browdy, S. Prior, A. Metz, P. Parnell, P. Gross y G. Warr. 2004. Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. *J. Virol.* 78: 10442-10448.
- Robalino, J., T. Bartlett, E. Shepard, S. Prior, G. Jaramillo, E. Scura, R. W. Chapman, P. S. Gross, C. L. Browdy y G. W. Warr. 2005. Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response. *Journal of Virology* 79:13561–13571.
- Robles, M. M. y O. D. Salinas. 1993. Manual del II Curso de Cultivo Integral de Ostión Japonés *Crassostrea gigas*. Producción de larvas. En: López, E. A.; Cáceres, M. C.; Hoyos, C. F.; Rivera, Z. J.; Valdez, P. J.; Salinas, O. D.; Robles, M. M.; Serrano, G. S. (Eds.)(1993 mayo 17-23).
- Sarathi, M., M. C. Simon., V. P. Ahmed, S. R. Kumar., A. S. Hameed. 2008. Silencing VP28 gene of white spot syndrome virus of shrimp by bacterially expressed dsRNA. *Mar Biotechnol.* 10: 198-206.
- Schikorski, D., T. Renault, D. Saulnier, N. Faury, P. Moreau y J. F. Pépin. 2011. Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: Demonstration of oyster spat susceptibility. *Veterinary Research.* 42: 27. 10.1186/1297-9716-42-27
- Segarra, A., J. F. Pépin, I. Arzul, B. Morga, N. Faury y T. Renault. 2010. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Research* 153:92–99.
- Segarra, A., L. Baillon, D. Tourbiez, A. Benabdelmouna, N. Faury, N. Bourgougnon y T. Renault. 2014. Ostreid herpesvirus type 1 replication and host response in adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Veterinary Research.* 45:103.
- Swiss Institute of Bioinformatics. 2019. Malacoherpesviridae. [https://viralzone.expasy.org/529?outline=all by species](https://viralzone.expasy.org/529?outline=all%20by%20species)
- Terrados-Aguado, G. 2010. Función de la ADN polimerasa lambda en reparación de DNA y tumorigénesis. Tesis de doctorado. Universidad Autonoma de Madrid. Departamento de Biología Molecular. Madrid, España.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin y D. G. Higgins. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25:4876-4882.

- Tirasophon, W., Y. Roshorm y S. Panyim. 2005. Silencing of yellow head virus replication in penaeid shrimp cells by dsRNA. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 334:102-107.
- Tirasophon, W., Y. Roshorm y S. Panyim. 2005. Silencing of yellow head virus replication in penaeid shrimp cells by dsRNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 334: 102-107.
- Tovar-Hernández, M. A., T. F. Villalobos-Guerrero, B. Yañez-Rivera, J. M. Aguilar-Camacho y I. D. Ramírez-Santana. 2012. Guía de Invertebrados Acuáticos Exóticos de Sinaloa. Geomare, A. C., INE-SEMARNAT. México.
- Vasquez-Yeomans, R., J. Caceres-Martinez y A. F. Huerta. 2004. Herpes-like virus associated with eroded gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Mexico. *Journal of Shellfish Research* 23:417-420.
- Vásquez-Yeomans, R., M. García-Ortega y J. Cáceres-Martínez. 2010. Gill erosion and herpesvirus in *Crassostrea gigas* cultured in Baja California, Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms* 89:137-144.
- Vigneron, V., G. Sollic, H. Montanié y T. Renault. 2004. Detection of Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1) DNA in seawater by PCR: influence of water parameters in bioassays. *Diseases of Aquatic Organisms* 62:35-44.
- Wang, G., W. He, D. Song, J. Li, Y. Bao, R. Lu, J. Bi, K. Zhao y F. Gao. 2014. In vitro RNA interference targeting the DNA polymerase gene inhibits orf virus replication in primary ovine fetal turbinate cells. *Archives of Virology* 159:915-920.
- Wang, L., X. Song y L. Song. 2017. The oyster immunity. *Developmental and Comparative Immunology*. 10.1016/j.dci.2017.05.025
- Wang, X., M. Wang, Q. Xu, J. Xu. Z. Lv y L. Song. 2017. Two novel LRR and Ig domain-containing proteins from oyster *Crassostrea gigas* function as pattern recognition receptors and induce expression of cytokines. *Fish Shellfish Immunology*. 70: 308-318. 10.1016/j.fsi.2017.09.023.
- Witteveldt, J., C. C. Cifuentes, J. M. Vlak y M. C. Van Hulten. 2004. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. *Journal of virology*. 78: 2057-2061. 10.1128/JVI.78.4.2057-2061.2004
- Wu, Y., L. Lü, L. S. Yang, S. P. Weng, S. M. Chan y J. He. 2007. Inhibition of white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei* shrimp by sequence-specific siRNA. *Aquaculture* 271:21-30.
- Xie, J., L. Lu, M. Deng, S. Weng, J. Zhu, Y. Wu, L. Gan, S. Chan y J. He. 2005. Inhibition of reporter gen and Iridovirus-tiger frog virus in fish cell by RNA interference. *Virology* 338:43-54.

- Xu, J., F. Han y X. Zhang. 2007. Silencing shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes by siRNA. *Antiviral Research*. 73: 126-131. 0.1016/j.antiviral.2006.08.007
- You, Y., A. Cheng, M. Wang. R. Jia, K. Sun, Q. Yang, Y. Wu, D. Zhu, S. Chen, M. Liu, X. Liu, X. Zhao y X. Chen. 2017. The suppression of apoptosis by α -herpesvirus. *Cell Death and Disease*. 8: e2749. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.139>
- Zhang, Y., X. C. He y Z. N. Yu. (2011). Two homologues of inhibitor of NF- kappa B (I kappa B) are involved in the immune defense of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol*. 30: 1354-1361.
- Zhu, F. y X. Zhang. 2012. Protection of shrimp against white spot syndrome virus (WSSV) with β -1, 3-D-glucan-encapsulated vp28-siRNA particles. *Marine Biotechnology* 14:63-68.