



UNIVERSIDAD DE SONORA

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

POSGRADO EN BIOCENCIAS

**DESARROLLO DE UNA NANOPLATAFORMA PARA
LA ENCAPSULACIÓN DE ARNs CONTRA EL VIRUS
DEL SÍNDROME DE LA MANCHA BLANCA BASADO
EN LA CÁPSIDE RECOMBINANTE DEL
Penstyldensovirus DE DECÁPODOS 1.**

TESIS

que para obtener el grado de:

DOCTOR EN BIOCENCIAS

presenta:

ADÁN VALENZUELA CASTILLO

Hermsillo, Sonora, México

14 de febrero 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 **Doctor 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

ADÁN VALENZUELA CASTILLO

Autor

DRA. NOHEMÍ GÁMEZ MEZA

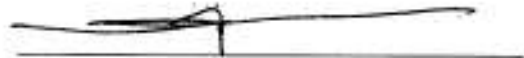
Coordinadora del Programa de Doctorado en Biociencias

APROBACIÓN

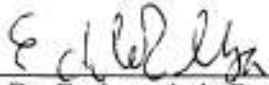
Los miembros del Comité designado para revisar la tesis titulada "Desarrollo de una Nanoplataforma para la Encapsulación de ARNs Contra el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca, Basado en la Cápside Recombinante del *Penstyldensovirus* de Decápodos I", presentada por Adán Valenzuela Castillo, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Biociencias.



Dr. José Manuel Grijalva Chon
Co-director



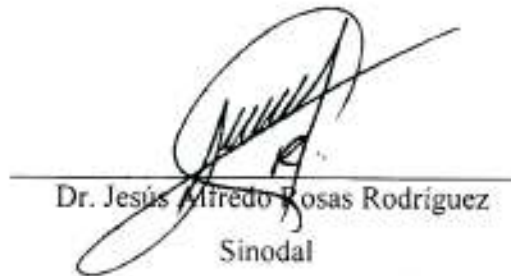
Dr. Arturo Sánchez Paz
Co-director



Dr. Enrique de la Re Vega
Sinodal



Dr. Marco Antonio López Torres
Sinodal



Dr. Jesús Alfredo Rosas Rodríguez
Sinodal

DEDICATORIA

“Cuando nos encontramos con una verdadera tragedia en nuestras vidas, podemos reaccionar de dos formas: perdiendo la esperanza y cayendo en nuestra propia destrucción, o usando ese reto para encontrar nuestra fuerza interior” (Tenzin Gyatso, 1939 -).

**A mis padres y hermanas;
que han estado siempre para mí,
con amor y apoyo incondicional en este trayecto
A Ana Carolina Gómez Yanes;
mi soporte y mi pilar,
mi maestra y ejemplo en la lucha,
mi amiga y mi compañera de vida.**

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora, el Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, al Posgrado en Biociencias y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por apoyarme en mis estudios de doctorado.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por permitirme realizar trabajo experimental en sus instalaciones.

A mis co-directores de tesis, Dr. José Manuel Grijalva Chon y Dr. Arturo Sánchez Paz ya que, sin su incondicional apoyo en el desarrollo de este trabajo de investigación, no hubiera sido posible terminarlo.

Al Dr. Enrique de la Re Vega, sinodal, por su invaluable comentarios y opiniones, así como su apoyo durante la encapsulación del ARN bicatenario, y, en general, su constante ayuda durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Marco Antonio López Torres, sinodal, debido a su aporte al desarrollo de mi trabajo de tesis, así como sus correcciones y comentarios.

Al Dr. Jesús Alfredo Rosas Rodríguez, sinodal, por su apoyo en lo relacionado a la purificación de las partículas pseudovirales mediante cromatografía de exclusión de peso molecular y las atenciones prestadas en su laboratorio. Además de sus aportes y comentarios durante el desarrollo de esta investigación.

A la Dra. Tania Lizbeth Enríquez Espinoza, M. en C. Fernando Mendoza Cano, M. en C. Trinidad Encinas García, Dr. Álvaro Santos Romo y al Ing. Juan Vega Peralta quienes me ayudaron de manera significativa durante la estancia en CIBNOR.

Al Departamento de Ciencias Químico Biológicas, de manera muy especial al Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores, por su aceptación para que desarrollara una gran parte del trabajo

experimental en el laboratorio LIA. De igual manera, al Q.A. Cesar Benjamín Otero León, M. en C. María Jesús Moreno Vásquez y al Dr. Manuel Ignacio Carretas Valdez por su ayuda y sus ánimos a seguir adelante día a día en el laboratorio.

A la M. en C. María Lucila Rascón Durán, por las atenciones prestadas en su laboratorio, así como su invaluable ayuda con la metodología de Western Blot.

A la Dra. Ofelia Rouzaud Sáñez, del laboratorio de Físicoquímica en alimentos del DIPA, por su desinteresado apoyo con el uso de la ultracentrífuga y por su atenta ayuda en la realización del protocolo de aislamiento de VLPs

A la Dra. Judith C. Tánori Córdova y al I.Q. Eduardo Larios Rodríguez, por su apoyo con la visualización de partículas pseudovirales mediante el microscopio de transmisión de electrones en el Laboratorio de Biofísica del Departamento de Física de la Universidad de Sonora.

Al Dr. Aarón de Jesús Rosas Durazo y a Rubio Pharma por su apoyo con la utilización del microscopio de fuerza atómica en el Núcleo de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico en el laboratorio Bionano de Rubio Pharma.

Al Dr. Rogerio Sotelo del Centro de Investigación en Alimentos (CIAD) por su ayuda en la realización de este proyecto y su amable atención durante mi estancia en su laboratorio

A la Dra. Adriana Muhlia Almazán, por su ayuda y comentarios, así como recibirme de manera muy atenta en su laboratorio cada vez que se necesitó.

Muy especialmente a la Biol. Ana Carolina Gómez Yanes, quien me enseñó gran parte de lo que ahora se acerca del trabajo experimental con proteínas e iniciadora de este proyecto, además de darme su apoyo día a día en todos los aspectos.

Una mención especial y agradecimiento a Alexandra Asanovna Elbakyan y a su equipo. Conocimiento libre para gente libre, para remover los obstáculos en el camino de la ciencia.

Listado de Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico
Ago: Enzima Argonauta
AHPND: Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda
AMPs: Péptidos con capacidad antimicrobiana
ARN: Ácido ribonucleico
ARNi: Mecanismo de interferencia por ARN
ARNcs: ARN de cadena sencilla
ARNds: ARN bicatenario
ARNds-*vp28*: ARNds específico contra el gen *vp28* del WSSV
ARNic: ARN interferente de cadena corta
ARNm: ARN mensajero
ARNmi: Micro ARN
ADNp: Ácido desoxirribonucleico plasmídico
ARNpi: ARN interferente asociado a PIWI
Ars-2: Proteína codificada por el gen de resistencia a arsénico
CCMV: Virus de moteado clorótico
CP: Proteína de la cápside
CPV: *Protoparvovirus* de carnívoros
CPMV: Virus del mosaico del caupí
CRUST: Crustinas
ddi: Después de inducir
dpi: Días post inoculación
EMS: Síndrome de la Mortalidad Temprana
FAL: Factor antilipopolisacarido
FMDV: Enfermedad de pie y boca
GFP: Proteína verde fluorescente
GmDNV: Densovirus de de la polilla de la cera *Galleria melonella*
HbV: Virus de la hepatitis B

HG: Hemocitos granulares
HH: Hemocitos hialinos
Hsc70: Proteína de choque térmico de 70 kDa
HSG: Hemocitos semigranulares
Hsp90: Proteína de choque térmico de 90 kDa
IHHN: Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa
IMN: Mionecrosis Infecciosa
JCV: Virus John Cunningham
LSNV: Virus de Laem-Singh
MrNV: Nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii*
NHP: Hepatopancreatitis Necrotizante
NHP-B: Bacteria de la Hepatopancreatitis Necrotizante
NS: Proteína no estructural
ORF: Marcos abiertos de lectura
PAMP: Patrones moleculares asociadas a patógenos
PAZ: Dominio Piwi – Argonauta – Zwillie
PEN: Peneidinas
PmCrus1: Crustina 1 de *P. monodon*
PmDENV: *Penaeus monodon* *Densovirus*
PRP: Proteínas de reconocimiento de patrones
proPO: Profenoloxidasa
PstDV1: *Penstyldensovirus* de decápodos 1
PstDV1-CP: Proteína de la cápside viral del PstDV1
RANKL: Gen activador del receptor para el ligando NF-kB
RDS: Síndrome del enanismo y deformidad
RISC: Complejo multienzimático silenciador inducido por ARN
SEC: Cromatografía de exclusión de peso molecular
SLN: Señal de localización nuclear
SSF: Solución Salina Fisiológica
TIM: Receptor dominio de inmunoglobulina y mucina de células T
TS: Enfermedad del Síndrome de Taura

TSV: Virus del Síndrome de Taura
VEC: Vesícula endocítica cubierta por clatrina
VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VLPs: Partículas pseudovirales
WSS: Enfermedad del Síndrome de la Mancha Blanca
WSSV: Virus del Síndrome de la Mancha Blanca
WTD: Enfermedad de la Cola Blanca
XSV: Virus extra diminuto
YHD: Enfermedad de la Cabeza Amarilla
YHV: Virus del Síndrome de la Cabeza Amarilla

ÍNDICE GENERAL

APROBACIÓN	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	6
I. INTRODUCCIÓN	7
II. ANTECEDENTES	11
II.1 Principales Enfermedades que Afectan el Cultivo de Camarones Peneidos	11
II.1.1 Enfermedades de Origen Bacteriano	11
II.1.1.1 Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda	11
II.1.1.2 Hepatopancreatitis Necrotizante	12
II.1.2 Enfermedades de Origen Viral	13
II.1.2.1 Enfermedad de la Cabeza Amarilla	13
II.1.2.2 Enfermedad de la Cola Blanca	14
II.1.2.3 Síndrome de Taura	15
II.1.2.4 Enfermedad de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa	16
II.1.2.5 Síndrome de la Mancha Blanca	19
II.2 Sistema de Respuesta Inmune en Camarones Peneidos	23
II.2.1 Mecanismo de Interferencia por ARN	27
II.3 Usos del Mecanismo ARNi para el Estudio y Control de Enfermedades	33
II.4 Métodos de entrega de ARNs	35
II.4.1 Administración de ARNs Desnudo por Inyección Intramuscular	35
II.4.2 Sistemas No Virales de Entrega de ARNs	39
II.4.3 Métodos Virales de Entrega de ARNs	42
II.4.3.1 Partículas Pseudovirales como Vehículos de Entrega	42

III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	49
IV. HIPÓTESIS	50
V. OBJETIVOS	51
V.1 Objetivo General.....	51
V.2 Objetivos Particulares	51
VI. METODOLOGÍA	52
VI.1 Sobreexpresión y Purificación de la Cápside del PstDV1	52
VI.1.1 Transformación bacteriana	52
VI.1.2 Sobreexpresión de la PstDV1-CP	52
VI.1.3 Solubilización de cuerpos de inclusión.....	53
VI.1.4 Replegamiento de la PstDV1-CP en cuerpos de inclusión	53
VI.1.5 Precipitación con sulfato de amonio.....	54
VI.1.6 Cromatografía de exclusión por peso molecular	54
VI.1.7 Ultracentrifugación con gradiente de sacarosa.....	55
VI.1.8 Identificación de proteínas recombinantes.....	55
VI.1.9 Microscopía electrónica de transmisión	56
VI.1.10 Microscopía de fuerza atómica.....	56
VI.2 Obtención de ARN Bicatenario del Gen <i>vp28</i>.....	57
VI.2.1 Amplificación del gen <i>vp28</i> de WSSV	57
VI.2.2 Purificación del amplicón del gen <i>vp28</i>.....	57
VI.2.3 Ligación.....	58
VI.2.4 Amplificación secundaria.....	58
VI.2.5 Transcripción a ARNcs	58
VI.2.6 Purificación de ARNcs.....	59
VI.2.7 Alineación	59
VI.3 Encapsulación de ARNds-<i>vp28</i> en las VLPs del PstDV1	60
VII.RESULTADOS.....	61
VII.1 Sobreexpresión de la PstDV1-CP	61
VII.2 Replegamiento de proteínas en cuerpos de inclusión	61
VII.3 Fraccionamiento proteico con sulfato de amonio	61

VII.4	Identificación de proteínas recombinantes.....	64
VII.5	Cromatografía de la Cápside del <i>Penstyldensovirus</i> de Decápodos 1.....	64
VII.6	Ultracentrifugación con Gradiente de Sacarosa	64
VII.7	Identificación de proteínas por Espectroscopía de Masas	64
VII.8	Visualización de las Partículas Virales y Pseudovirales Mediante TEM	67
VII.8	Visualización de Pseudopartículas Virales Mediante AFM.....	67
VII.9	Síntesis de ARNs	69
VII.10	Encapsulación de ARNs- <i>vp28</i> en las VLPs del PstDV1.....	69
VIII.	DISCUSIÓN	73
VIII.1	Purificación de la cápside del <i>Penstyldensovirus</i> de decápodos 1.....	73
VIII.2	Visualización de Partículas Pseudovirales por Microscopía	76
VIII.3	Síntesis de ARNs- <i>vp28</i>	77
VIII.4	Encapsulación de ARNs- <i>vp28</i> en VLPs del PstDV1.....	78
IX.	CONCLUSIONES	82
X.	RECOMENDACIONES	84
XI.	REFERENCIAS	86

RESUMEN

El crecimiento y desarrollo de la camaronicultura se ha visto frenado por diversas afecciones de causa viral, disminuyendo la producción de manera significativa en la última década. Actualmente se conocen más de 30 especies de virus que tienen la capacidad de provocar enfermedades en crustáceos marinos, de los cuales el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) y el *Penstylidensovirus* de decápodos 1 (PstDV1) representan dos de las mayores amenazas para el cultivo y pesquería de camarón. De estos patógenos, el WSSV es considerado como uno de los patógenos que más pérdidas económicas ha generado a la industria acuícola, pudiendo llegar a provocar la muerte del 100% de los organismos cultivados en un período de 3 a 10 días posteriores a los primeros signos clínicos. El PstDV1, por su lado, no provoca eventos de mortalidades masivas, sin embargo, su infección causa una serie de deformaciones en especímenes del camarón blanco *Penaeus vannamei*, que conlleva finalmente a una pérdida importante de su valor comercial. Debido a las características estructurales de la cápside del PstDV1, se ha sugerido que las partículas pseudovirales (VLPs) derivadas del mismo, pudieran ser utilizadas como vehículo acarreador de biomoléculas, como ARN bicatenario (ARNds), para inmunostimular a camarones peneidos ante la infección de agentes patógenos. Mediante la administración de ARNds se puede abolir la expresión de prácticamente cualquier gen, sea este del hospedero o del patógeno, con el fin de evitar la síntesis de proteínas clave para evitar así el establecimiento de una infección fructífera. La proteína estructural VP28 es considerada como un factor clave durante el proceso infeccioso del WSSV, al contar con distintas funciones que se consideran fundamentales para que el WSSV pueda infectar una célula. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo es desarrollar una nanoplataforma de administración de ARNds contra el gen *vp28* (ARNds-*vp28*) encapsulado en VLPs recombinantes del PstDV1. Para lo cual, se transformaron bacterias *E. coli* para sobreexpresar la proteína de la cápside del PstDV1. Se ensamblaron VLPs del PstDV1 *in-vitro* y se purificaron por medio de ultracentrifugación con gradiente de sacarosa. Se sintetizó ARNdh-*vp28* y se encapsuló en las VLPs del PstDV1, obteniendo como resultado la encapsulación de 75 ng de ARNdh-*vp28*. Finalmente, se comprobó que dichas partículas son capaces de proteger el ARNds encapsulado contra la acción de nucleasas

ABSTRACT

The growth and development of shrimp farming has been slowed by various viral diseases, significantly reducing production in the last decade. To date, more than 30 species of viruses with the capacity to cause diseases in marine crustaceans have been described, of which the white spot syndrome virus (WSSV) and the *decapod Penstyldensovirus 1* (PstDV1) represent two of the greatest threats to the crop and shrimp fishery. Of these pathogens, the WSSV is considered one of the pathogens that has generated the most significant economic losses to the aquaculture industry, being able to cause the death of 100% of the cultivated organisms in a period of 3 to 10 days, after the onset of the first clinical signs. The PstDV1 does not cause events of massive mortalities, however, it provokes, in the white shrimp *Penaeus vannamei*, a series of deformations in infected specimens, which finally leads to a great loss of commercial value. Due to the structural characteristics of the capsid of PstDV1, it has been suggested that pseudoviral particles (VLPs) derived from it could be used as a carrier vehicle for biomolecules, such as double-stranded RNA (dsRNA), to immunostimulate penaeid shrimp before the infection of pathogens. Through the administration of dsRNA, the expression of practically any gene, be it from the host or the pathogen, can be abolished in order to avoid the synthesis of key proteins to avoid the establishment of a fruitful infection. The structural protein VP28 is considered as a key factor during the WSSV infectious process, having different functions that are considered fundamental for the WSSV to infect a cell. For this reason, the objective of this work is to develop a nanoplateform of administration of dsRNA against the *vp28* gene (dsRNA-*vp28*) encapsulated in recombinant VLPs of PstDV1. For which, *Escherichia coli* bacteria were transformed to overexpress the capsid protein of PstDV1. PstDV1 VLPs were assembled in vitro and purified by ultracentrifugation with sucrose gradient. dsRNA-*vp28* was synthesized and encapsulated in the VLPs of PstDV1, resulting in the encapsulation of 75 ng of dsRNA-*vp28*. Finally, it was proved that the VLPs were capable to protect the encapsulated dsRNA from nucleases activity.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación esquemática del virus del síndrome de la mancha blanca. Tomado de Sánchez-Paz (2010).....	21
2	Estructura de la VP26 de WSSV. (a) Diagrama de listones del monómero de la VP26. Los extremos amino (N) y carboxilo (C) son señalados. (b) Diagrama de listones del trímero de la VP26. (c) Vista superior del trímero de la VP26. Tomado de Tang <i>et al.</i> , (2007).....	21
3	Diagrama de listones de la VP28 del WSSV. (a) Monómero de la VP28. Los extremos amino (N) y carboxilo (C) son señalados. (b) Una unidad asimétrica de la VP28 consiste de 12 moléculas de 4 trímeros. Esta figura muestra un trímero de la unidad asimétrica. Cada monómero del trímero es mostrado con un color diferente. (c) Vista superior del trímero de la VP28. Tomado de Tang <i>et al.</i> , (2007).....	22
4	Mecanismo de interferencia por ARN en camarones peneidos. Ante la presencia de ARNs exógeno en el interior de la célula se lleva a cabo la activación del mecanismo ARNi. 1) La doble hélice es reconocida por Dicer-2, en conjunto con proteínas accesorias que aumentan su afinidad por la misma. 2) Dicer-2 corta los ARNs en fragmentos de ARNi de ~21 nt, pudiendo generar un <i>pool</i> o cargarlos a RISC. 3) Se lleva a cabo el acoplamiento del ARNi a Ago-2, teniendo como resultado la formación del complejo Pre-RISC. 4) Ago-2 desenrolla la doble hélice y degrada la hebra pasajera, quedando la hebra guía acoplada al complejo RISC-maduro, que cuenta con capacidad de degradar a ARNm que tengan complementariedad de bases con la hebra guía. 5) RISC interactúa con el ARNm diana por medio de la hebra guía, acoplándose a esta a través de distintos cambios conformacionales. 6) Se lleva a cabo el corte endonucleolítico del ARNm, la separación del mismo del complejo y finalmente se lleva a cabo su degradación. Modificado de Nguyen <i>et al.</i> (2016).....	29
5	Esquema de la estructura de Dicer-2. En la figura se muestran los distintos dominios que conforman una enzima Dicer-2 canónica, compuesta por dos dominios ARNasa III, PAZ DUF238, DExD/H ATPasa (subdominios HEL1, HEL2 y HEL2i) y el dominio de ligación de ARNs. El número y disposición de los dominios puede variar dependiendo de la especie. Modificado de Lau <i>et al.</i> (2012).....	30
6	Esquema de la enzima Ago-2. Las proteínas Ago-2 canónicas se encuentran constituidas por los dominios PAZ, N-terminal o dominio N, MID y PIWI. El sitio activo, dependiente de iones Mg^{2+} , cuenta con actividad ARNasa H. Tomado de Jinek y Doudna (2009).....	32

7	Esquema de las cápsides de distintos parvovirus. PstDV1, <i>Penstydensovirus</i> de decápodos 1; CPV <i>Protoparvovirus</i> de carnívoros (parvovirus canino); GmDENV, <i>Galleria mellonella Densovirus</i> . Modificado de Kaufmann <i>et al.</i> (2010).....	43
8	Sobreexpresión de PstDV1. Carril M, marcador de peso molecular; carril 2, precipitado 0 h ddi; carril 3, sobrenadante 0 h ddi; carril 4, precipitado 4 h ddi; carril 5, sobrenadante 4 h ddi; carril 6, precipitado 6 h ddi; carril 7, sobrenadante 6 h ddi; carril 8, precipitado 20 h ddi; carril 9, sobrenadante 20 h ddi.....	62
9	SDS PAGE del replegamiento de proteínas en cuerpos de inclusión. Carril M, marcador de peso molecular; carril 2, proteína en 8M urea; carril 3, proteína en 4M urea; carril 4, proteína en 2M urea; carril 5, proteína en 1M urea; carril 6, proteína en 0.5 M urea.....	63
10	Fraccionamiento con sulfato de amonio. Carril M, marcador de peso molecular; carril 2, fracción 20% de (NH ₄) ₂ SO ₄ ; carril 3, fracción 40% de (NH ₄) ₂ SO ₄ ; carril 4, fracción 60% de (NH ₄) ₂ SO ₄ ; carril 5, sobrenadante..	63
11	Western-blot. Carril M, marcador de peso molecular; carril 2 muestra....	65
12	SEC de la cápside del <i>Penstydensovirus</i> de decápodos 1. Cromatografía de exclusión de peso molecular a partir de las proteínas fracción 40% de (NH ₄) ₂ SO ₄	65
13	Fracciones de elusión obtenidas mediante cromatografía de exclusión de peso molecular. Carril M Marcador de peso molecular; carril 1 fracciones 13-17; carril 2 fracciones 25-27; carril 3, fracciones 33-37; carril 4, fracciones 44-48; carril 5, cuerpos de inclusión 8M urea.....	66
14	SDS-PAGE de las fracciones 13-17 una vez concentradas. Carril M, marcador de peso molecular; carril 1, muestra concentrada.....	66
15	SDS-PAGE de fraccionamiento proteico por gradiente de sacarosa. Las proteínas presentes en cada una de las fracciones del gradiente se analizaron mediante SDS-PAGE, encontrándose distintas similitudes entre estas. Carril M, marcador de peso molecular; carriles 1-7 fracciones 70-10% de sacarosa, en orden descendente.....	67
16	Microscopia electrónica de transmisión de A) partículas pseudovirales y B) partículas en el inóculo viral. En ambos casos las partículas medían alrededor de 22 nm.....	68

17	Microscopía de fuerza atómica. Las partículas pseudovirales contenidas en la muestra, presentaron un diámetro aproximado de 22 nm, una vez que se visualizaron utilizando una celda de 200 nm.....	68
18	Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del gen <i>vp28</i> . Carril M, marcador de peso molecular; Carril 1, amplicón <i>vp28</i>	70
19	Electroforesis de los transcritos de sentido positivo y antisentido, en contraste con ARNds- <i>vp28</i> . Carril 1, marcador de peso molecular; Carril 1, transcrito de sentido positivo; Carril 2, transcrito antisentido; Carril 3, ARNds- <i>vp28</i>	70
20	Figura 20. Controles de digestión de ARNds y ausencia de ARN en la VLP. Carril M, marcador de peso molecular; Carril 1, vacío; Carril 2, ARNds- <i>vp28</i> tratado con 0.1 mg/ml de RNase A, Concert (Life Technologies); Carril 3, ARNds- <i>vp28</i> tratado con 0.2 mg/ml de RNase A, Concert; Carril 4, cápside vacía.....	71
21	Electroforesis de la encapsulación de ARNds- <i>vp28</i> en las VLPs derivadas del PstDV1. Carril M, marcador de peso molecular; Carril 1. VLPs cargadas con ARNds- <i>vp28</i> sin tratamiento de nucleasas; Carril 2, VLPs cargadas con ARNds- <i>vp28</i> sometidas al tratamiento con nucleasas; Carril 3, 500 ng de ARNds- <i>vp28</i> como control.....	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1 Rendimiento del replegamiento de proteínas en cuerpos de inclusión. A partir de un total de 198 mg de proteína que se encontraban desnaturalizadas en cuerpos de inclusión, se obtuvo un total de 183.54 mg una vez se finalizó el protocolo de replegamiento.....	63

I. INTRODUCCIÓN

En el 2008, la actividad acuícola alcanzó su máximo histórico en México, produciendo 130,201 toneladas (TM) de camarón (FAO, 2012). Sin embargo, el crecimiento y desarrollo de la camaronicultura se ha visto frenado por diversas afecciones de causa viral (Mañón-Ríos, 2010), teniendo como resultado eventos de mortalidades masivas (Martínez-Córdova *et al.*, 2009). Es así que, en los últimos años la producción ha ido en detrimento, de tal manera que para el año 2012 tan sólo se produjeron 100,320 TM (FAO, 2012).

Hoy en día, se conocen más de 30 especies de virus que tienen la capacidad de provocar enfermedades en crustáceos marinos (Citarasu, 2012), de los cuales el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV, por sus siglas en inglés) y el *Penstylidensovirus* de decápodos 1 (PstDV1) representan dos de las mayores amenazas para el cultivo y pesquería de camarón. De estos patógenos, el WSSV es considerado como uno de los patógenos que más pérdidas económicas ha generado a la industria acuícola, pudiendo llegar a provocar la muerte del 100% de los organismos cultivados en un período de 3 a 10 días, posteriores a los primeros signos clínicos. Este virus puede infectar una gran variedad de especies de interés acuícola, incluyendo camarones, cangrejos y langostas, entre otros (Sánchez-Paz, 2010; Rai *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2018).

Taxonómicamente, el WSSV es considerado como el único miembro del género *Whispovirus*, familia *Nimaviridae*. Es un virus envuelto, no-ocluido, de forma baciliforme y que posee un apéndice filamentoso. Al día de hoy, las proteínas que conforman al virión se han estudiado ampliamente y se reconocen tres capas que recubren al genoma viral, una envoltura exterior, un tegumento y una nucleocápside (Liu *et al.*, 2014). La envoltura viral del WSSV consiste en al menos 35 proteínas diferentes, de las cuales la VP26 y la VP28 son las más abundantes (Tang *et al.*, 2007). Las proteínas de la envoltura de muchas especies de virus, juegan un rol muy importante durante la infección, y de las dos proteínas mencionadas, se ha relacionado a la VP28 con un mayor número de interacciones con proteínas de las células hospederas, incluidas varios tipos de lectinas, las proteínas gC1qR y fortalina, así como la

interacción con el receptor de membrana Rab7, siendo considerada como de importancia vital durante el proceso infeccioso (Shekhar y Ponniah, 2014; Verbruggen *et al.*, 2016). No obstante, no existe a la fecha un tratamiento que pudiera llegar a evitar infección y diseminación descontrolada del WSSV (Sánchez-Paz, 2010). Se han reportado distintas estrategias profilácticas que han demostrado su eficacia para combatir los efectos del WSSV, sin embargo, las vías de administración no son las más adecuadas.

En cuanto al patógeno PstDV1, del grupo de los parvovirus, se le ha asociado a eventos de mortalidades masivas (>90%) en juveniles y pre-adultos de camarón azul *Penaeus stylirostris*, además de ser el agente causal del síndrome del enanismo y deformidad (RDS, por sus siglas en inglés) en camarón blanco *P. vannamei* (Vega-Heredia *et al.*, 2012; Grijalva-Chon y Castro-Longoria, 2015; Sellars *et al.*, 2019).

Las partículas virales del PstDV1 carecen de envoltura, tienen un diámetro de 22 nm y forma icosaédrica (Vega-Heredia *et al.*, 2012; Dhar *et al.*, 2013), y la cápside está compuesta por sesenta subunidades estructuralmente equivalentes de una proteína de 37.5 kDa, denominada proteína de cápside (PstDV1-CP), que posee un motivo barril- β tipo remolino (“jelly roll” en inglés) similar al que se encuentra en varios virus icosaédricos, incluyendo otros parvovirus (Kaufmann *et al.*, 2010). La cápside, como en otros parvovirus, tiene como objetivo principal el empaquetar el genoma viral, así como interaccionar con los receptores virales específicos (Cotmore y Tattersall, 2014). Se ha sugerido que, debido a las características de la cápside del PstDV1, las partículas pseudovirales (VLPs, por sus siglas en inglés) del mismo podrían ser utilizadas como nanoplataformas para la entrega de distintas moléculas de carácter inmunoestimulante, o bien ARN bicatenario (ARNds), a manera de tratamiento profiláctico contra distintos patógenos de camarones peneidos (Hou *et al.*, 2009; Kaufmann *et al.*, 2010; Sánchez-Paz *et al.*, 2014).

En respuesta a la presencia de ARNds, exógeno o endógeno, en el interior de una determinada célula, se da inicio a un mecanismo celular conocido como interferencia por ARN (ARNi) (Cottrell y Doering, 2003; Kemp *et al.*, 2013). Se ha sugerido que el ARNi es un mecanismo de respuesta inmune antiviral, altamente conservado en distintas de especies estudiadas al día de hoy, incluyendo artrópodos, nemátodos y plantas, entre otros. Además de contribuir en la regulación de la expresión génica (Kemp *et al.*, 2013; Watson *et al.*, 2014;

Berkhout, 2018; Ding *et al.*, 2018; Green y Speck, 2018; Tome *et al.*, 2018; Yang y Li, 2018). En años recientes se ha explotado este mecanismo para tratar distintos tipos de enfermedades, en diferentes especies, con resultados positivos, entre estas se encuentran distintos tipos de cáncer, hipercolesterolemia, hemofilia y afecciones virales, mediante el silenciamiento de genes específicos (Huvenne y Smagghe, 2010; Wittrup y Lieberman, 2015; Dana *et al.*, 2017).

Una vez que se activa el ARNi, el ARNd es segmentado en fragmentos de 21-30 nucleótidos (nt), llamados ARN interferente de cadena corta (ARNic), mediante la acción de una enzima de tipo RNasa III denominada Dicer (Huvenne y Smagghe, 2010; Ding *et al.*, 2018; Tome *et al.*, 2018). Los ARNic resultantes interactúan con el complejo multienzimático silenciador inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés), que tiene la capacidad de escindir la doble hebra del ácido nucleico, dando como resultado dos moléculas de ARN monocatenario, denominadas guía (antisentido) y pasajero (sentido positivo). La hebra guía es posteriormente incorporada al conglomerado (Kalantari *et al.*, 2016; Dana *et al.*, 2017), seguido de lo cual, el complejo cargado con la cadena sencilla de ARNic, adquiere la capacidad de reconocer e interactuar con los ARN mensajeros (ARNm) que presenten complementariedad de bases con la cadena guía acoplada. Una vez que el ARNm se alinea con la cadena en RISC, es catabolizado y degradado por una proteína conocida como Argonauta (Ago), teniendo como resultado el silenciamiento (supresión) de la expresión de un determinado gen (Siomi y Siomi, 2009; Wilson y Doudna, 2013; Dana *et al.*, 2017; Berkhout, 2018).

El ARNd desnudo, por lo general, puede ingresar a las células mediante la vía endocítica (Saleh *et al.*, 2006), sin embargo el tratamiento basado en la entrega sistémica de ARNds desnudo carece de especificidad, en cuanto a tipos de células se refiere. Además, por lo general, este tipo de metodología requiere de la manipulación individual de cada espécimen a tratar, ya sea por inyección intramuscular u otros (Sánchez-Paz *et al.*, 2014), lo que la vuelve impráctica al aplicarla a gran escala. Por lo tanto, el uso de métodos que faciliten la entrega de ARNds a tejidos y células específicas, es de gran importancia para generar tratamientos con alta especificidad (Dana *et al.*, 2017). En este sentido, el uso de VLPs para encapsular ARNds pudiera resultar ampliamente ventajoso, ya que estas conservan las características estructurales de los virus incluyendo aquellas que confieren el tropismo viral, al poder interactuar con receptores celulares específicos (Hou *et al.*, 2009; Lua *et al.*, 2013). Debido a lo anterior, VLPs cargadas con ARNds específico contra genes de importancia, para el proceso infeccioso de un

determinado agente etiológico, pueden ingresar a células diana y liberar el ARN bicatenario, activando el sistema ARNi. Por ende, lo anterior podría fungir como un tratamiento profiláctico, al preparar a dichas células confiriéndoles la capacidad de silenciar genes vitales del agente biológico patógeno, dificultando el establecimiento de una infección fructífera.

Tomando en cuenta el grave impacto que tiene el WSSV sobre la industria camaronícola, es indudable el hecho de que se requiere del desarrollo estrategias antivirales que puedan evitar la aparición y diseminación del agente etiológico. En relación a lo anterior, como se mencionó previamente, el tratamiento basado en ARNds para tratar patologías de origen viral ha tenido resultados positivos, en las distintas especies estudiadas al día de hoy. No obstante, las metodologías comúnmente utilizadas para la entrega del ARNds, debido al gran número de organismos cultivados, resultan poco prácticas al aplicarlas en granjas camaronícolas. En este sentido, la utilización de VLPs derivadas del PstDV1 para la encapsulación y entrega de ARNds, específico contra genes de vital importancia para el proceso infeccioso del WSSV, podrían resultar en la generación de un tratamiento profiláctico contra dicho patógeno. No obstante, hasta donde se sabe, no existen a la fecha métodos reportados que permitan la entrega de ARN bicatenario de la manera antes mencionada. Por lo tanto, el presente estudio está enfocado en el desarrollo de una metodología para encapsular ARNds específico contra el gen *vp28* del WSSV (ARNds-*vp28*), en partículas pseudovirales derivadas del PstDV1.

II. ANTECEDENTES

II.1 Principales Enfermedades que Afectan el Cultivo de Camarones Peneidos

Como se mencionó anteriormente, la producción acuícola es una actividad en auge alrededor del mundo, de tal manera que, mientras que en el año 1996 se cultivaban alrededor de 291 especies, para el año 2016 se incrementó la cantidad de especies cultivadas a aproximadamente 426. De manera similar, ha habido un gran aumento en cuanto a producción, mientras que en el año 2006 se tuvo una producción global de 61,592,158 t, para el año 2016 la producción se elevó a alrededor de 110,208,218 t, lo que significó un incremento en la producción de divisas de alrededor de \$161,881,000,000 USD (FAO, 2018). Sin embargo, las enfermedades provocadas por distintos patógenos afectan de manera significativa a esta industria. Lo anterior, debido que las enfermedades provocadas por los dichos patógenos generan pérdidas monetarias asociadas al efecto que estas puedan tener en el hospedero y, en muchos casos, aumentan en gran medida los costos de producción (Lafferty *et al.*, 2015). En cuanto a la camaronicultura, en la lista de enfermedades notificables ante la OIE se incluyen dos enfermedades de origen bacteriano: la Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND, por sus siglas en inglés) y la Hepatopancreatitis Necrotizante (NHP); y varias enfermedades virales, entre las que destacan la Enfermedad de la Cabeza Amarilla (YHD), la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (IHHN), la Mionecrosis Infecciosa (IMN), la Enfermedad del Síndrome de Taura (TS), la Enfermedad del Síndrome de la Mancha Blanca (WSS) y la Enfermedad de la Cola Blanca (WTD). Estas últimas, son consideradas como una seria amenaza para la actividad camaronícola. A continuación, se detallan algunas características de estas enfermedades y sus agentes causales.

II.1.1 Enfermedades de Origen Bacteriano

II.1.1.1 Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda

El primer reporte de la Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND, por sus siglas en inglés), anteriormente conocida como Síndrome de la Mortalidad Temprana

(EMS, por sus siglas en inglés), se llevó a cabo en China en el 2009, desde donde se distribuyó rápidamente por Asia, en países como Vietnam, Malasia y Tailandia, en el período 2010-2012. Posteriormente, durante el 2013, se reportaron los primeros casos en México (Lai *et al.*, 2015; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Hong *et al.*, 2016). El agente etiológico es una cepa de la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* que posee un plásmido que codifica para la síntesis de dos toxinas de naturaleza protéica, PirA^{VP} y PirB^{VP} (Lai *et al.*, 2015). Distintas especies de camarón son afectadas por esta cepa, incluidas *P. vannamei* y *P. monodon*. Los signos clínicos de esta patología son, letargo, disminución en la ingesta de alimentos, estómago e intestino vacíos, así como encogimiento y decoloración del hepatopáncreas (Hong *et al.*, 2015; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015). La AHPND puede provocar mortalidades del 100% en estanques afectados, en un tiempo de 20-30 días posteriores a la siembra de post-larva, poco tiempo después de que aparecen los primeros signos clínicos (Lai *et al.*, 2015).

II.1.1.2 Hepatopancreatitis Necrotizante

La NHP se reportó por primera vez en Texas, Estados Unidos de América, en 1985, y posteriormente se distribuyó por el continente Americano, en países como Perú, Ecuador, Colombia, Venezuela, Brasil, Nicaragua, Panamá, Costa Rica y México (Bradley-Dunlop *et al.*, 2004; Vincent y Lotz, 2005), donde, por lo general, se presentan eventos epizooticos de manera estacional, durante los cuales, la mortalidad acumulada puede variar entre el 20 - 95%, en cada uno de los estanques afectados, pudiendo llegar a provocar pérdidas monetarias significativas (Loy *et al.*, 1996; Bradley-Dunlop *et al.*, 2004). Esta enfermedad es provocada por la Bacteria de la Hepatopancreatitis Necrotizante (NHP-B, por sus siglas en inglés), cuya transmisión ocurre de manera horizontal (Vincent *et al.*, 2004; Vincent y Lotz, 2005). Entre las especies de camarón afectadas por este patógeno se encuentran *P. vannamei*, *P. setiferus*, *P. stylirostris*, *P. aztecus* y *P. californiensis* (Bradley-Dunlop *et al.*, 2004).

Entre los signos clínicos de la NHP, se observa una disminución del consumo de alimento en camarones infectados, así como el intestino vacío, letargo y disminución en el crecimiento. Así mismo, presentan flacidez en el cuerpo y un caparazón blando. Por otra parte, el órgano diana de la NHP-B es el hepatopáncreas, el cual se atrofia progresivamente durante el desarrollo de la enfermedad (Bradley-Dunlop *et al.*, 2004).

II.1.2 Enfermedades de Origen Viral

II.1.2.1 Enfermedad de la Cabeza Amarilla

Los primeros reportes acerca de la Enfermedad de la Cabeza Amarilla (YHD, por sus siglas en inglés) ocurrieron en especímenes de camarones de la especie *P. monodon* al inicio de la década de los 90, en Tailandia. Posteriormente, la presencia de este patógeno se extendió a través de Asia, afectando fuertemente los cultivos existentes (Dhar *et al.*, 2004; Mohr *et al.*, 2015). No obstante, los brotes de la enfermedad disminuyeron, tanto en severidad, como en frecuencia. La YHD es provocada por el Virus de la Cabeza Amarilla (YHV, por sus siglas en inglés). Además de *P. monodon*, el YHV es capaz de infectar otras especies de crustáceos, como *P. vannamei*, *P. stylirostris*, *P. aztecus*, *Metapenaeus ensis*, *Paleomon styliferus*, *Acetes* spp., y *P. merguensis*, entre otros (Assavalapsakul *et al.*, 2006). Por otra parte, se sabe que algunas especies de plancton, como *Euphausia superba*, pueden servir como vectores de la enfermedad (Dhar *et al.*, 2004).

Entre los signos clínicos característicos de la YHD, se encuentran el incremento en la ingesta de alimento, seguido de un abrupto cese de la misma. El cuerpo de los camarones adquiere un color pálido, mientras que las branquias pueden tener coloraciones amarillentas, blanquecinas o cafés. Así mismo, el hepatopáncreas se torna de color amarillento (Dhar *et al.*, 2004; Stentiford *et al.*, 2009). Por lo general, las mortalidades masivas se presentan 2-3 días después de la aparición de los signos clínicos descritos (Anantasomboon *et al.*, 2008).

La infección por YHV puede permanecer latente, a la vez que los organismos infectados no presentan ningún signo clínico en específico, por lo que se vuelven portadores, así como vectores para la transmisión de esta enfermedad. Este patógeno es capaz de transmitirse tanto de manera horizontal, como vertical (Dhar *et al.*, 2004). Por otra parte, el YHV puede permanecer en estado viable fuera del hospedero, en agua salada, hasta por 72 h (Stentiford *et al.*, 2009), por lo que es de considerar ampliamente el determinar protocolos de bioseguridad y desinfección de las facilidades de cultivo, de tal manera que se puedan evitar este tipo de eventos.

La prevalencia de este virus oscila entre el 50-100%, tanto en organismos cultivados como silvestres, en distintos países de África, Asia y Australia (Dhar *et al.*, 2004; Assavalapsakul *et al.*, 2006; Anantasomboon *et al.*, 2008; Stentiford *et al.*, 2009). Aunque ha

habido reportes en México (De la Rosa-Vélez *et al.*, 2006; Castro-Longoria *et al.*, 2008; Sánchez-Barajas *et al.*, 2009), este virus no ha causado problemas graves. Aranguren *et al.* (2013) mencionan que la ausencia de epizootias causadas por este virus se debe a la posible interacción con el virus del Taura.

El YHV es integrante de la familia *Roniviridae* y género *Okavirus*. Sus partículas virales tienen envoltura y son de forma alargada, en su interior se encuentra una nucleocápside helicoidal, albergando un genoma lineal de (+) ARNcs de aproximadamente 32 kb. Los viriones están constituidos por tres proteínas estructurales: gp116, gp64 y p22. De las anteriores, las dos primeras conforman la envoltura viral, mientras que la última constituye la nucleocápside (Stentiford *et al.*, 2009)

II.1.2.2 Enfermedad de la Cola Blanca

Se reportó por primera vez en India, a mediados de la década de los 90, en donde se registraron índices de mortalidad cercanos al 100%, en post-larva de *M. rosenbergii* (Sudhakaran *et al.*, 2006; Ravi *et al.*, 2009). Si bien este padecimiento se relaciona comúnmente con la especie de langostino antes mencionada, se sabe que también puede afectar distintas especies de camarones en estadios larvales, provocando mortalidades masivas en post-larva (Ravi *et al.*, 2009; Senapin *et al.*, 2013). Las especies que, hasta donde se sabe, pueden verse afectadas por la WTD son *P. vannamei*, *P. monodon* y *P. indicus* (Senapin *et al.*, 2013).

Esta enfermedad es causada por el nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* (*MrNV*). En camarones, el signo clínico más notable es el desarrollo de una coloración blanquecina a nivel del tejido muscular (Senapin *et al.*, 2012, 2013), mientras que en *M. rosenbergii* provoca letargo, opacidad del músculo abdominal y la degeneración del telson (Sudhakaran *et al.*, 2007). La transmisión del *MrNV* se da de manera horizontal, ya sea por organismos de la misma especie infectados, o bien por medio de vectores, así como por viriones libres (Sudhakaran *et al.*, 2008)

El *MrNV* es integrante de la familia *Nodaviridae*, carece de envoltura y cuenta con una cápside icosaédrica. La última, está compuesta por una proteína de 43 kDa dentro de la cual se alberga el genoma viral, compuesto por (+) ARNcs segmentado. Por lo general, se le encuentra asociado con el Virus Extra Pequeño (XSV) (Senapin *et al.*, 2012).

II.1.2.3 Síndrome de Taura

A inicios de la década de los 90, se registraron los primeros casos de TS, en camarones provenientes de granjas ubicadas en la Provincia de Guayas en Ecuador, cerca de la desembocadura del río Taura. Posteriormente, se diseminó rápidamente por el continente americano, así como a Asia, en países como Taiwán y Tailandia, a través de la movilización de organismos vivos infectados, lo que provocó grandes pérdidas económicas a la industria camaronícola (se estima que tan sólo en los años 90, el TSV produjo pérdidas económicas en América Latina cercanas a los 1.3 mil millones de dólares) (Lightner *et al.*, 1995; Tu *et al.*, 1999; Mari *et al.*, 2002). A partir de entonces, los surgimientos de esta enfermedad han resultado en eventos epizooticos con mortalidades masivas (>85%), provocando grandes pérdidas económicas (Hasson *et al.*, 1995; Dhar *et al.*, 2004).

En 1995, el agente etiológico responsable de la TS, fue identificado como el Virus del Síndrome de Taura (TSV, por sus siglas en inglés). Este patógeno, tiene la capacidad de infectar distintas especies de camarones peneidos, como *P. vannamei*, *P. stylirostris*, *P. schmitti* y *P. chinensis*, entre otros (Overstreet *et al.*, 1997). En cuanto al proceso de transmisión viral, se sabe que el excremento de algunas aves marinas, puede contribuir a dicho fenómeno, ya que las partículas virales contenidas en él permanecen activas y son infectivas. Así mismo, se puede transmitir de manera horizontal (Dhar *et al.*, 2004).

El TSV es altamente patogénico cuando infecta a especímenes en estadios larvales o juveniles, los camarones son especialmente susceptibles a este patógeno durante los procesos de premuda. Entre los signos clínicos se encuentran la apreciación de un color rojizo en la cola, así como distintas lesiones melanizadas y manchas en la cutícula. Por lo general, los camarones mueren debido a una falla sistemática generalizada, a los pocos días de aparecer los primeros signos clínicos. No obstante, si el camarón infectado sobrevive a la enfermedad, el virus sigue latente, por lo que se convertirá en un portador crónico, que a su vez sirve como vector para diseminar la enfermedad, lo cual es altamente importante para fines de cultivo (Hasson *et al.*, 1995; Lightner *et al.*, 1995; Tu *et al.*, 1999; Dhar *et al.*, 2004).

Debido a su morfología (icosaedro no envuelto de 31-32 nm), replicación citoplásmica, densidad de flotación (1.338 g/mL), genoma lineal de RNA monocatenario (+) de unas 9 kb, y la composición de su cápside (tres proteínas principales de 55, 40 y 24 kDa), el TSV ha sido

clasificado dentro de la familia *Picornaviridae* (Robles-Sikisaka *et al.*, 2001), siendo el único miembro de esta familia capaz de infectar decápodos.

II.1.2.4 Enfermedad de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa

Como se mencionó anteriormente, el agente etiológico responsable de la IHHN es el PstDV1. El primer reporte sobre su existencia ocurrió en 1981, en Hawái, en donde causó altos índices de mortalidad en cultivos de organismos juveniles del camarón azul *P. stylirostris*. Los primeros signos clínicos observables son nado letárgico en la superficie, nado invertido en el fondo, coloración opaca en el tejido muscular, falta de movimiento y muerte (Vega-Heredia *et al.*, 2012).

En la década de 1990, dicho virus provocó mortalidades masivas superiores al 90% en cultivos del camarón azul *Penaeus stylirostris* en México (Robles-Sikisaka *et al.*, 2010), lo cual obligó a los productores a optar por utilizar una especie de cultivo que se consideraba más resistente a enfermedades: *P. vannamei* (Martínez-Córdova *et al.*, 2009). No obstante, tiempo después el PstDV1 fue detectado en *P. vannamei*, y a pesar de que en dicha especie este virus no provoca mortalidades, su infección resulta en la disminución significativa del tamaño de los especímenes infectados, deformación de la cutícula y de las antenas, así como anomalías en la región abdominal y la desviación del rostro (Kalagayan *et al.*, 1991; Vega-Heredia *et al.*, 2012), y como consecuencia la pérdida de hasta el 50% del valor comercial (Motte *et al.*, 2003; Martorelli *et al.*, 2010). Por otra parte, *P. monodon* no presenta signos clínicos distinguibles (Vega-Heredia *et al.*, 2012). Entre las especies de peneidos susceptibles a esta enfermedad, se encuentran *P. stylirostris*, *P. vannamei*, *P. monodon*, *P. occidentalis*, *P. californiensis*, *P. semisulcatus* y *P. japonicus* (Bonami, 2010).

Al día de hoy, se sabe que el PstDV1 se transmite a través de los individuos infectados que sobreviven a la enfermedad, tanto de manera vertical y horizontal, así como por agua contaminada con el virus (Motte *et al.*, 2003; Lightner, 2011), y que sus tejidos diana son de origen ectodérmico (epidermis, epitelio hipodérmico del intestino anterior y posterior, cordón nervioso y ganglios nerviosos) y mesodérmico (órgano hematopoyético, glándula antenal, gónadas, órgano linfóide y tejido conectivo) (Dhar *et al.*, 2014). Por otra parte, es probable que gran parte de los huevos de hembras fuertemente infectadas no se desarrollen, aunado a que los nauplios producidos tendrán una alta prevalencia viral (Dhar *et al.*, 2014).

Debido a sus características morfológicas y genómicas, el PstDV1 se clasificó como virus de la familia *Parvoviridae* (Bonami *et al.*, 1990), además de ser miembro de la subfamilia *Densovirinae* (Tattersall, 2006; Mañón-Ríos, 2010; Martorelli *et al.*, 2010). Gracias a la secuenciación casi total de su genoma, se le clasificó dentro del género *Brevidensovirus* (Shike *et al.*, 2000). Recientemente, debido a ciertas características que lo diferencian, se ha propuesto su asignación al género *Penstyldensovirus* (Cotmore *et al.*, 2014).

Dentro la cápside del PstDV1 se encuentra un genoma lineal de ADN de una sola hebra de 4.1 kb, en el que se encuentran 3 marcos abiertos de lectura (ORFs) que codifican tres proteínas (dos no estructurales, NS-1 y NS-2, y la PstDV1-CP) (Vega-Heredia *et al.*, 2012; Dhar *et al.*, 2014), además de un ORF conocido como “*small ORF*” que codifica un péptido de función desconocida (Dhar *et al.*, 2014). Yang *et al.* (2012) han sugerido que la NS-2 interactúa con los filamentos de actina de hemocitos de camarones de la especie *Marsupenaeus japonicus*, durante el proceso de internalización viral. En cuanto a la NS-1, distintos autores señalan que, de acuerdo a su secuencia de aminoácidos, esta cuenta con un dominio ligador de nucleósido-trifosfato, así como con una región con función helicasa, altamente homóloga a la NS1 de otros parvovirus (Shike *et al.*, 2000; Vega-Heredia *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012; Dhar *et al.*, 2014). Además, la PstDV1-CP, como en otros parvovirus, tiene como rol principal el de empaquetar el genoma viral, así como interactuar con los receptores virales específicos (Cotmore y Tattersall, 2014).

La familia *Parvoviridae* incluye a todos aquellos virus de tamaño pequeño (22-26 nm), icosaédricos, carentes de envoltura, conteniendo ADN lineal monocatenario de aproximadamente 4 - 6 Kb (Cotmore y Tattersall, 2007; Cotmore *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2014; Johnson y Dudleenamjil, 2012). Esta familia se divide en las subfamilias *Parvovirinae* y *Densovirinae*, dependiendo de su gama de hospederos. Mientras que los miembros de la familia *Parvovirinae* son capaces de infectar vertebrados, los segundos infectan insectos y otros artrópodos, como camarones y langostas (Tattersall, 2006; Wang *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2014). Los signos clínicos que estos provocan, así como la severidad de los mismos, varían desde subclínicos hasta infecciones letales, dependiendo tanto del virus como de la edad y susceptibilidad del hospedero (Harbison *et al.*, 2008).

Los virus pertenecientes a la familia *Parvoviridae* comparten diversas características, sin embargo, se han encontrado diferencias entre estos patógenos, dentro de las cuales destacan

la superficie de la cápside, y las proteínas que la conforman. Al día de hoy se sabe que estos patógenos pueden utilizar diferentes estructuras membranales como receptores que permitan la entrada al interior de la célula hospedera, como glucoproteínas, glucolípidos y glucanos (Cotmore y Tattersall, 2007; Harbison *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2014).

Los parvovirus poseen una cápside con estructura icosaédrica T=1, y carecen de envoltura viral (Cotmore y Tattersall, 2007). Además, ésta se encuentra conformada por 60 subunidades proteicas estructuralmente equivalentes, conformadas por una proteína mayoritaria (CP1) y un determinado porcentaje de copias de otras dos proteínas (CP2 y CP3), que se diferencian de la primera por tener un extremo N-terminal extendido, en cuanto a cantidad de aminoácidos. Por lo general, de las proteínas de la cápside (CP) de los parvovirus la CP1 posee en su extremo N-terminal un dominio con actividad fosfolipasa (FLA2), esencial para el escape del endosoma (Cotmore y Tattersall, 2007), y uno de señal de localización nuclear (SLN), que hace posible la importación viral al interior del núcleo de la célula hospedera (Pöhlmann y Simmons, 2013), ambos rasgos son considerados cruciales durante el proceso infeccioso (Boisvert *et al.*, 2010; Kaufmann *et al.*, 2010, 2011).

Una de las características principales de las proteínas de la cápside de estos patógenos es su conformación estructural como barriles β antiparalelos de 8 hebras, alrededor de los cuales se forman distintas estructuras que rigen la antigenicidad del virus, así como la unión a receptores y los contactos entre subunidades (Tijssen, 1999; Kaufmann *et al.*, 2010, 2011). La superficie de la cápside de los parvovirus, por lo general, está conformada por protrusiones en, o alrededor de los ejes de simetría triple, depresiones en los ejes de simetría doble, y cañones en los ejes de simetría quintuple (Huang *et al.*, 2002; Kaufmann *et al.*, 2011; Murgia, 2012; Modrow *et al.*, 2013). De acuerdo con Rossmann (1989), en las depresiones denominadas “cañones” es en donde se encuentran las regiones de la cápside responsables del reconocimiento de los receptores celulares, también llamados receptores virales.

Según Kaufmann *et al.* (2010) a pesar de que la PstDV1-CP tiene similitud, en cuanto a su conformación, con las CP de otros virus de la misma familia, en especial con la del densovirus de la polilla de la cera *Galleria melonella* (GmDNV), la superficie de la cápside del PstDV1 es diferente a todos los parvovirus conocidos a la fecha. Como se mencionó anteriormente, estos mismos autores han sugerido que debido a sus pequeñas dimensiones, la cápside de PstDV1 tiene un alto potencial como vector para entregar moléculas de carácter inmunoestimulante, o

bien ARNds. El tratamiento con ARN de doble hebra ha sido utilizado con éxito para inhibir la replicación de distintos virus en camarón (La Fauce y Owens, 2009; Ho *et al.*, 2011; Posiri *et al.*, 2013). Por otra parte, Hou *et al.* (2009) demostraron que las VLPs derivadas del virus antes mencionado puede ingresar a las células de *P. vannamei*. Por lo que la cápside de este patógeno podría ser utilizada como un agente de control para otros agentes patogénicos.

II.1.2.5 Síndrome de la Mancha Blanca

El virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), probablemente el virus más letal que infecta a los camarones peneidos, es un virus de replicación rápida y extremadamente virulento, que tiene una distribución muy amplia y con una prevalencia muy elevada. El WSSV apareció por vez primera en Taiwán en 1992, desde donde se dispersó hacia otros países asiáticos (Sánchez-Martínez *et al.*, 2007; Oidtmann y Stentiford, 2011). El primer caso diagnosticado de WSSV en América ocurrió en 1995 en una granja de cultivo de camarón al sur de Texas, Estados Unidos, y se ha especulado que su introducción fue a través de camarón congelado proveniente de Asia (Hasson *et al.*, 2006). Actualmente, existen reportes de WSSV en una gran cantidad de países alrededor del mundo (Escobedo-Bonilla *et al.*, 2008).

Los camarones infectados con WSSV pueden desarrollar rápidamente manchas blancas (de ahí su nombre) en el exoesqueleto con un diámetro que oscila entre los 0.5-3.0 mm. Sin embargo, dado que dichas manchas no siempre se desarrollan y que algunas enfermedades de origen bacteriano provocan la aparición de manchas similares, no se consideran un signo clínico confiable para el diagnóstico preliminar de la enfermedad. Otros signos clínicos de la enfermedad por WSSV incluyen letargia, una reducción repentina en el consumo de alimento, coloración rojiza del cuerpo y apéndices del organismo, y la pérdida de la cutícula, y finalmente la muerte (Escobedo-Bonilla *et al.*, 2008; Sánchez-Paz, 2010). Este patógeno, puede llegar a causar mortalidades de 100% en los primeros 3-10 días, después de la aparición de los primeros signos clínicos (Oidtmann y Stentiford, 2011).

Los viriones del WSSV poseen morfología bacilar con una extensión en uno de sus extremos que semeja un flagelo, sin embargo, su función y estructura permanecen sin definir (Durand *et al.*, 1997). Las dimensiones del virus oscilan entre los 210-420 nm de longitud y 70-167 nm de diámetro (Guoxing *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1997) (Figura 1). Los viriones están cubiertos por una envoltura con una estructura aparentemente similar a la de la membrana

lipídica que protege la nucleocápside, la cual está compuesta por 15 hélices verticales (Durand *et al.*, 1997). A su vez, cada hélice está conformada por 13-15 capsómeros (Huang *et al.*, 2001).

La envoltura viral del WSSV está constituida por cerca de 30 diferentes proteínas (Zhang *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007; Tsai *et al.*, 2006), de las cuales la VP26 y la VP28 son las más abundantes, y constituyen juntas aproximadamente el 60% de la envoltura (Tang *et al.*, 2007). La VP26, producto del marco de lectura abierta (ORF, por sus siglas en inglés) *wsv311*, se identificó por vez primera como asociada a la nucleocápside (Van Hulten *et al.*, 2000), sin embargo un estudio posterior demostró que esta proteína se localiza en el espacio entre la envoltura viral y la nucleocápside y funciona como una proteína que une ambas estructuras (Zhang *et al.*, 2002). La estructura de la VP26 consiste de nueve barriles beta (β b) con hojas beta anti-paralelas ($\beta 1 \downarrow \beta 2 \uparrow \beta 3 \downarrow \beta 4 \downarrow \beta 5 \uparrow \beta 6 \downarrow \beta 7 \uparrow \beta 8 \downarrow \beta 9 \uparrow$). Además, una hoja beta de doble hebra ($\beta 1 \downarrow \beta 9 \uparrow$) se proyecta fuera del barril beta de forma casi paralela al eje de la proteína. Esta estructura genera la formación de un poro de naturaleza altamente hidrofóbico con cadenas laterales de tres residuos de fenilalanina, siete de isoleucina, cinco de metionina, y cuatro de valina, para un total de cadenas laterales hidrofóbicas alineadas en el interior de la superficie de dicho poro. Las dimensiones aproximadas de los β b son de 38.3 Å de alto por 15.5 Å de diámetro (Figura 2) (Tang *et al.*, 2007). Algunos estudios han sugerido que esta proteína puede intervenir en la transportación del WSSV hacia el núcleo celular al interactuar con la actina o con otras proteínas de unión a la actina (Xie *et al.*, 2005).

Por otro lado, la proteína VP28 es codificada por el ORF *wsv421*, y es la principal proteína de envoltura del WSSV y varios estudios sugieren que podría desempeñar un papel esencial en los procesos iniciales de la infección por el WSSV (Van Hulten *et al.*, 2001). En cuanto a su estructura, se ha determinado, mediante difracción de rayos x, que la VP28 exhibe un β b y una hélice alfa que se proyecta fuera de la arquitectura del β b. Un total de nueve hebras beta ($\beta 1 \downarrow \beta 2 \uparrow \beta 3 \downarrow \beta 4 \downarrow \beta 5 \uparrow \beta 6 \downarrow \beta 7 \uparrow \beta 8 \downarrow \beta 9 \uparrow$), en su mayoría antiparalelas, forman el β b. Las dimensiones de β b son aproximadamente de 35 Å de altura por 15 Å de diámetro. Como en el caso de la VP26, la VP28 posee un poro formado en su forma trimérica, altamente hidrofóbico, y que contiene 25 residuos que se alinean en su interior, formado por siete fenilalaninas, ocho isoleucinas, una leucina, cuatro metioninas, y cinco valinas (Figura 3) (Tang *et al.*, 2007).

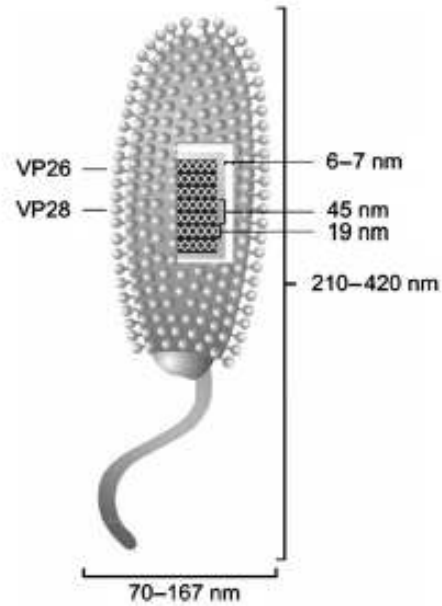


Figura 1. Representación esquemática del virus del síndrome de la mancha blanca. Tomado de Sánchez-Paz (2010).

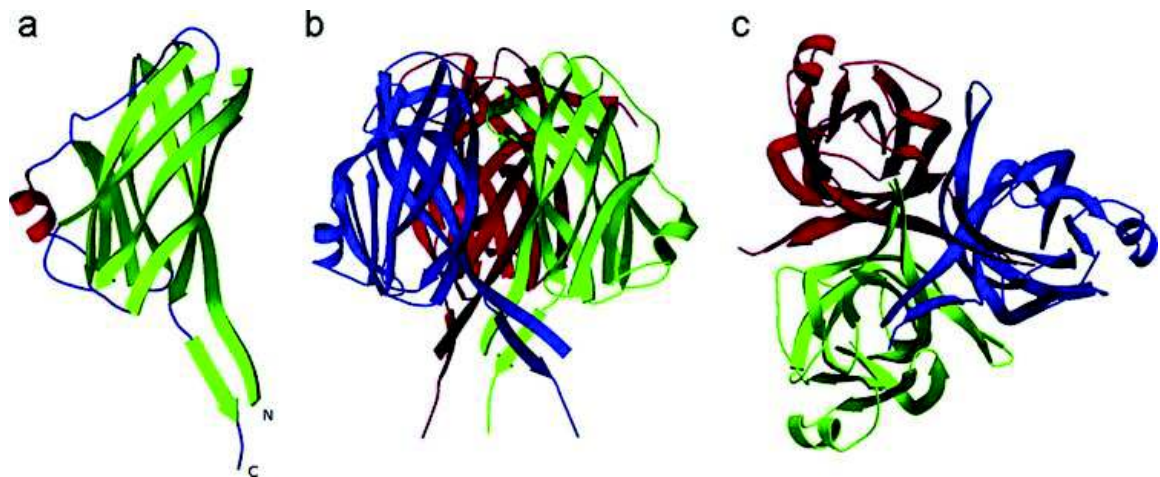


Figura 2. Estructura de la VP26 de WSSV. (a) Diagrama de listones del monómero de la VP26. Los extremos amino (N) y carboxilo (C) son señalados. (b) Diagrama de listones del trímero de la VP26. (c) Vista superior del trímero de la VP26. Tomado de Tang *et al.* (2007).

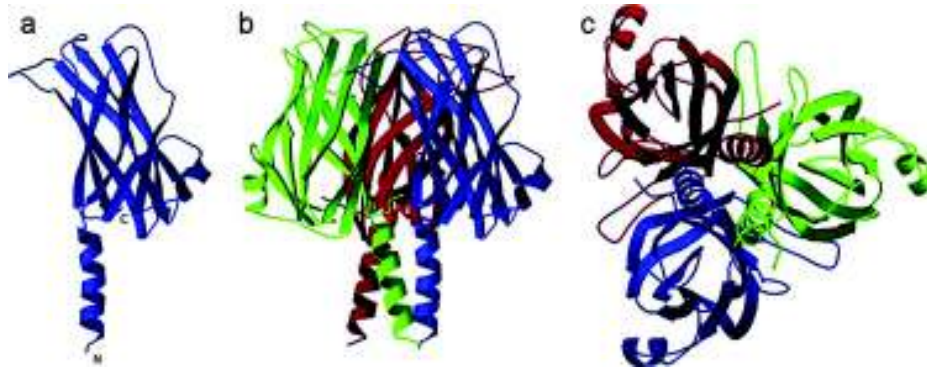


Figura 3. Diagrama de listones de la VP28 del WSSV. (a) Monómero de la VP28. Los extremos amino (N) y carboxilo (C) son señalados. (b) Una unidad asimétrica de la VP28 consiste de 12 moléculas de 4 trímeros. Esta figura muestra un trímero de la unidad asimétrica. Cada monómero del trímero es mostrado con un color diferente. (c) Vista superior del trímero de la VP28. Tomado de Tang *et al.* (2007).

Los resultados de estudios como el de Yi *et al.* (2004) han demostrado que la VP28 participa en el proceso infeccioso como una proteína de anclaje que se liga a las células del camarón en un ambiente de bajo pH, interviniendo en la entrada al citoplasma. Otro estudio sugiere que esta proteína contribuye al proceso infeccioso en el reconocimiento de receptores celulares de la superficie celular del hospedero debido a la presencia de algunos sitios potenciales de glicosilación (Tsai *et al.*, 2004). Recientemente se demostró que tanto la VP26 como la VP28 forman trímeros que se proyectan de la envoltura viral y que podrían interactuar con los receptores celulares del hospedero (Xie *et al.*, 2005). Así, se ha reportado que la proteína PmRab7 del camarón tigre *Penaeus monodon* interactúa directamente con la VP28 (Sritunyalucksana *et al.*, 2006).

El genoma del WSSV está formado por una molécula circular de doble hebra con una tamaño que oscila entre los 292,967 y 307,287 pares de bases (pb), y contiene aproximadamente 184 ORFs, de los cuales solamente el 6% tiene homólogos putativos con genes que codifican proteínas conocidas en otros organismos (Sánchez-Paz, 2010), y de los cuales la mayoría codifican enzimas involucradas en el metabolismo de nucleótidos, replicación del ADN y modificaciones de proteínas (Van Hulten *et al.*, 2001).

Debido a sus características morfológicas y genómicas, desde 2002, el Comité Internacional de Nomenclatura de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés), incluyó al WSSV como la especie tipo del género *Whispovirus*, familia *Nimaviridae*. El nombre de la familia refleja la característica morfológica más notable del virus: la proyección polar de un filamento similar a un flagelo (el término *nima* en latín significa filamento). Así, el WSSV es la única especie de una familia monotípica llamada *Nimaviridae* (género *Whispovirus*) (Marks *et al.*, 2004).

El patógeno causal del WSS, es el WSSV. Tras su infección, los organismos manifiestan diversos signos clínicos, entre los que se encuentra el desarrollo de coloración rojiza en el cefalotórax y apéndices, letargo, disminución en la ingesta de alimento, nado lento cerca de la superficie, Por otra parte, el WSSV puede transmitirse tanto de manera horizontal (Durand y Lightner, 2002; Lotz y Soto, 2002), como vertical (Lo *et al.*, 1997), y posee una amplia distribución geográfica, ya que se ha reportado tanto en Asia, África, Europa, América y Australia. Por otro lado, este virus es capaz de infectar cerca de 100 especies de crustáceos (incluyendo cangrejos, camarones, y langostas), así como rotíferos e insectos, y además se ha demostrado que algunas especies de poliquetos y moluscos pueden ser portadoras del virus (Sánchez-Paz, 2010). Así mismo, las partículas virales se mantienen viables, una vez expuestas al agua salada, pudiendo infectar camarones sanos sin la necesidad de un vector intermediario (Sánchez-Martínez *et al.*, 2007; Sánchez-Paz, 2010; Oidtmann y Stentiford, 2011).

Finalmente, vale la pena resaltar que hasta la fecha no existe una estrategia terapéutica comercial disponible y efectiva que puede contrarrestar los efectos negativos de este virus (Sánchez-Paz *et al.*, 2012).

II.2 Sistema de Respuesta Inmune en Camarones Peneidos

El sistema de respuesta en camarones peneidos, como en otros crustáceos, cuenta con dos tipos de elementos, los celulares y los humorales (Cárcamo-Aréchiga *et al.*, 2016). De los anteriores, los elementos celulares están compuestos por células denominadas hemocitos, mismas que son responsables de mediar en gran medida la respuesta inmune en camarones peneidos, mientras que los componentes humorales son sustancias sintetizadas por los hemocitos, los cuales cuentan con propiedades antimicrobianas y/o de reconocimiento de patógenos (Chiu *et al.*, 2007; Cerenius *et al.*, 2010b).

Por lo general, los crustáceos cuentan con tres tipos de hemocitos, morfológicamente distintos, siendo estos los hialinos (HH), semigranulares (HSG) y granulares (HG). Estas células, cuentan con distintas funciones. Las primeras, tienen la capacidad de fagocitar patógenos invasores. Mientras que los dos restantes, cuentan con funciones de almacenamiento y liberación de factores humorales, así como de citotoxicidad. No obstante, sólo los HSG cuentan con capacidad de encapsulamiento de agentes patogénicos, además de fagocitar patógenos (Johansson *et al.*, 2000; Vazquez *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2014).

La activación del sistema de respuesta de peneidos, se lleva a cabo debido a la existencia de moléculas con patrones moleculares asociadas a patógenos (PAMP), como lipopolisacáridos, b-1-3-glucanos, distintos carbohidratos y ácidos nucleicos. Los PAMP interactúan con receptores celulares específicos, denominados proteínas de reconocimiento de patrones (PRP), como la proteína ligadora de lipopolisacáridos, proteína de reconocimiento de patrón β -1-3-glucano y las lectinas, que tienen un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CDC), entre otros (Chiu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Li y Xiang, 2013). Una vez que se lleva a cabo dicha interacción, el PRP se activa, cambiando su conformación estructural, a la vez que genera una respuesta a nivel intracelular (Li y Xiang, 2013).

Seguido de la activación del PRP, se promueve la degranulación de los HSG y HG (Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000; Wang *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009). De estos gránulos, se liberan distintas moléculas efectoras del sistema inmune, como los péptidos con capacidad antimicrobiana (AMPs) y diversos factores asociados. Entre los AMPs, se encuentran las peneidinas (PEN; 4 clases: 2-5), crustinas (CRUST; 3 tipos: I-III) y el factor antilipopolisacárido (FAL), entre otros (Cerenius *et al.*, 2010a; Hauton, 2012). Las PEN cuentan con actividad de opsonina, antibacteriana y antifúngica (Vazquez *et al.*, 2009), así mismo se ha sugerido que pudieran llevar a cabo funciones de protección durante procesos de infección viral (Hauton, 2012).

Las CRUST, son AMPs que se han detectado en diversas especies de crustáceos y son de gran importancia en la respuesta inmune de este grupo de especies, en general (Hauton, 2012; Sudheer *et al.*, 2015). Las anteriores, son secretadas al plasma, donde ejercen su actividad antimicrobiana en contra de bacterias gram-positivas y gram-negativas, así como antifúngica, antiprotozoarios y, posiblemente, actividad antiviral (Cerenius *et al.*, 2010b; Prapavorarat *et al.*,

2010; Hauton, 2012). De manera similar el FAL, es una AMP con amplio espectro de actividad antimicrobiana, en respuesta a la misma gama de patógenos que las CRUST, sin embargo, contrario a estas últimas, la actividad antiviral de FAL ha sido corroborada (Liu *et al.*, 2006a)

Aunado a lo anterior, se libera la profenoloxidasa (proPO), la cual es el precursor clave de la melanina, esta se encuentra como precursor inactivo dentro de los hemocitos, una vez es liberada es activada por iones calcio. De tal forma, cataliza la conversión de fenoles a quinonas, la cuales son los precursores directos de la melanina. La última, así como sus intermediarios, es considerada como un antifúngico y antibacteriano, además de que tiene la capacidad de reparar viejas heridas y de melanizar el exoesqueleto del camarón (Johansson *et al.*, 2000; Cerenius *et al.*, 2008, 2010b). Por otra parte, la activación del sistema proPO, ayuda a expandir esta respuesta en el sistema, ya que propicia la degranulación de hemocitos que se encuentren aledaños al sitio de activación del PRP, y tiene como fin la erradicación de agentes patogénicos (Zhang *et al.*, 2007; Cerenius *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011).

En conjunto con proPO, se liberan factores asociados, como la transglutaminasa (TGasa), la cual está involucrada en la coagulación. Esta ruta, se activa cuando la integridad de la piel es comprometida, liberando hemolinfa. Una vez que la TGasa es liberada por los hemocitos, forma homopolímeros que tienen la capacidad de sellar la herida, impidiendo la pérdida de hemolinfa (Theopold *et al.*, 2004; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006).

Producto de la degranulación de HSG y HG, se libera una molécula denominada peroxinectina (PE), que provoca que las bacterias se adhieran a superficies inespecíficas, a la vez que promueve la encapsulación y, al actuar como opsonina, fagocitosis de las bacterias adheridas (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006). Por otra parte, la PE cuenta con funciones de peroxidasa, así como de propagación de la activación del sistema proPO, ya que promueve la degranulación de las células granulares (Cerenius *et al.*, 2008).

Las lectinas son proteínas multifuncionales que pueden encontrarse en membrana y hemolinfa. Son consideradas como un tipo de receptor membranal, denominados proteínas de reconocimiento de patrones. y se les asocia con distintos roles biológicos, así como con el reconocimiento de agentes exógenos (non-self). Estas proteínas cuentan con un dominio de reconocimiento de patrones de carbohidratos (CRD) específicos, por lo que existen lectinas que pueden reconocer solamente carbohidratos N-acetilados, o bien O-acetilados (Marques y Barracco, 2000; Vazquez *et al.*, 2009; Cerenius *et al.*, 2010b; Freire *et al.*, 2012).

La mayor parte de las lectinas, son consideradas como “tipo C” (LectC), sin embargo, existen lectinas que tienen la capacidad de reconocer sustancias diferentes a los carbohidratos, las cuales se denominan lectinas parecidas a tipo C. Cuando las lectinas se encuentran libres en hemolinfa, se considera que actúan con actividad de tipo opsonina. De tal forma, tienen el rol de marcar a determinadas estructuras como agentes exógenos, lo cual a su vez activa o potencia la fagocitosis por parte de los hemocitos hialinos (Cerenius *et al.*, 2010b). Así mismo, están relacionadas con procesos de aglutinación alrededor de los patógenos, una vez que son reconocidos (Marques y Barracco, 2000; Cerenius *et al.*, 2010b). Las LectC, pueden inducir el proceso de encapsulación por parte de los hemocitos semigranulados alrededor de patógenos de gran tamaño, como esporas y parásitos presentes en la hemolinfa. Por otra parte, las lectinas pudieran estar involucradas en la activación del sistema proPO, ya que la proPO puede ser activada, entre otros factores, por ciertas proteasas, mientras que las lectinas tienen la capacidad de potenciar el efecto de las proteasas bajo determinadas condiciones (Chen *et al.*, 1995; Cerenius *et al.*, 2010b; Wang y Wang, 2013). Además de coadyuvar a activar y potenciar el sistema de respuesta de crustáceos, se les atribuyen distintos tipos de actividad en contra de patógenos como bacterias y hongos, mediante la disrupción de la membrana celular, así como en algunos virus como opsonina interaccionando con proteínas estructurales (Cerenius *et al.*, 2010b; Wang y Wang, 2013).

Entre los eventos celulares, involucrados en la respuesta a patógenos, la apoptosis, o muerte celular programada, es de gran importancia al mantener un control entre las células con funciones normales de un organismo, que se encuentran dañadas, a la vez que podría estar relacionada con la respuesta inmune ante infecciones virales (Cerenius *et al.*, 2010b; Xu *et al.*, 2014).. Los cambios celulares morfológicos de las células apoptóticas, son la deformación de la membrana celular, encogimiento celular, y cambios en el núcleo, debido a la condensación de la cromatina y fragmentación del ADN (Jin y El-Deiry, 2005).

La encapsulación es una respuesta multicelular que tiene como fin el eliminar partículas exógenas o patógenos invasores (>10 μm), las cuales no pueden ser destruidas por mecanismos humorales. Este proceso se inicia una vez que el patógeno interacciona con una opsonina, o bien con factores de adhesión, dándose una movilización de HSG al sitio, cubriendo al agente invasor con varias capas de hemocitos (5-30), aunado a mucopolisacáridos y glicoproteínas. Dentro de

la partícula formada, el patógeno muere por falta de oxígeno y por acción de hidrolasas o quinonas (Vazquez *et al.*, 2009).

Un proceso de gran importancia, tanto para el mantenimiento de la homeostasis, como para la respuesta inmune, es la fagocitosis. En gran parte, mediante este proceso se elimina y se dispone de agentes invasores. Una vez que un patógeno es reconocido, ya sea por contacto directo con un receptor, o mediante una opsonina, se inicia el proceso de fagocitosis, durante el cual se llevan a cabo modificaciones a nivel de la membrana celular y del citoesqueleto. El agente patogénico es introducido a los HH, donde es degradado mediante enzimas que se encuentran en el interior de organelos especializados, denominados fagosomas (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006; Li y Xiang, 2012).

La respuesta inmune antiviral es mediada en gran parte por el mecanismo ARNi, como se mencionó anteriormente, este se activa ante la presencia de ARNds exógeno o endógeno en el interior de una célula (Chen *et al.*, 2012; Itsathitphaisarn *et al.*, 2017). En el caso del ARN exógeno, el ARNi puede reconocer el genoma constituido por ARN bicatenario de los virus de ARNds, o bien el ARNds viral generado durante el proceso infeccioso de algunos virus de DNA o ARN lineal de sentido positivo (Weber *et al.*, 2006; Itsathitphaisarn *et al.*, 2017). Una vez que las proteínas que conforman dicho mecanismo detectan el ARNds, este es degradado a través de distintos mecanismos moleculares, que incluyen la separación de la doble hebra y el corte del mismo en fragmentos de menor tamaño, entre otros (Nguyen *et al.*, 2016). Lo anterior tiene como resultado la inmunoestimulación del hospedero, que adquiere la capacidad de silenciar o inhibir los genes virales codificados en la secuencia de ARNds catalizada (Underwood *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2016). Este mecanismo se describe con mayor detalle en la siguiente sección.

II.2.1 Mecanismo de Interferencia por ARN

En mamíferos la respuesta antiviral depende directamente de la activación de la cascada de señalización de interferón, mediada por el reconocimiento de epítopes virales por parte de la familia de receptores celulares Toll y RIG (Kemp *et al.*, 2013). Es comúnmente aceptado que el sistema de respuesta antiviral es mediado por ARN de cadena corta (ARNcc) en plantas, nemátodos, plantas y artrópodos, incluyendo camarones peneidos, está conformado por componentes proteicos específicos que generan e interaccionan con fragmentos de ARNds, con

una extensión aproximada entre 19 y 30 pb, los cuales se subdividen en ARNic, micro ARN (ARNmi) y ARN interferente asociado a PIWI (ARNpi) (Kemp *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2014; Berkhout, 2018; Ding *et al.*, 2018). De los anteriores, el ARNic, por lo general, es generado en respuesta a ARNs exógenos de cadena larga, mientras que los ARNmi y ARNpi, generalmente son generados de manera endógena, y, además, tienen roles importantes en cuanto a la regulación de la expresión génica, por lo que se consideran esenciales para el desarrollo de organismos multicelulares (He *et al.*, 2004; Johnson, 2011; Xu *et al.*, 2014; Iwasaki *et al.*, 2015). Por otra parte, los ARNpi están involucrados en la regulación de transposones (Zamore, 2007; Marraffini y Sontheimer, 2010; Iwasaki *et al.*, 2015), lo cual sugiere que una de sus principales funciones es el cuidado de la integridad del genoma.

Como se mencionó anteriormente, el primer paso del ARNi (Figura 4) es el reconocimiento del ARNs de cadena larga por Dicer y la segmentación del mismo en pequeños fragmentos de ARN bicatenario (19-25 pb). Sin embargo, en distintos organismos los de cadena corta (ARNcc) son procesados por elementos diferentes de la maquinaria del ARNi (Xu *et al.*, 2014). En la mayoría de los vertebrados y los gusanos, que sólo cuentan con un subtipo de la enzima Dicer, tanto ARNic como ARNmi son producidos por la misma enzima. No obstante, en artrópodos, como algunas especies de camarones, incluyendo a *P. vannamei* y la mosca *Drosophila melanogaster*, existen cuando menos 2 variantes de esta enzima, Dicer-1 y Dicer-2, estando el primer subtipo encargado de procesar ARNmi y el segundo ARNic (Hammond, 2005; Sabin *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2014). Se ha sugerido que Dicer-2 tiene un mayor rol en la respuesta antiviral, pudiendo funcionar de manera análoga a los receptores RIG en mamíferos, al detectar ARN exógeno e iniciar la cascada de señalización ARNi (Sabin *et al.*, 2013; Tome *et al.*, 2018). La familia de proteínas Dicer se caracteriza por contener en su estructura los dominios DExD/H ATPasa (actividad ARN helicasa), DUF283 (posiblemente tiene actividad de ligación de ARNs o ARNm), un dominio Piwi – Argonauta – Zwiille (PAZ), dos dominios en tándem RNasa III y un dominio de ligación de ARNs (Figura 5) (Dlakic, 2006; Mierlo *et al.*, 2011; Kurzynska-Kokorniak *et al.*, 2016). El dominio PAZ tiene la capacidad de interactuar con los extremos del ARNs de cadena larga, posicionándolo desde la superficie de la proteína hacia el sitio activo (Mierlo *et al.*, 2011), no obstante Dicer-2, por sí sólo, interacciona débilmente con el ARN bicatenario (Sigova y Zamore, 2008). Hoy en día, es sabido que, en algunos artrópodos, al inicio del mecanismo ARNi Dicer-2 interactúa con distintas proteínas accesorias, que a su

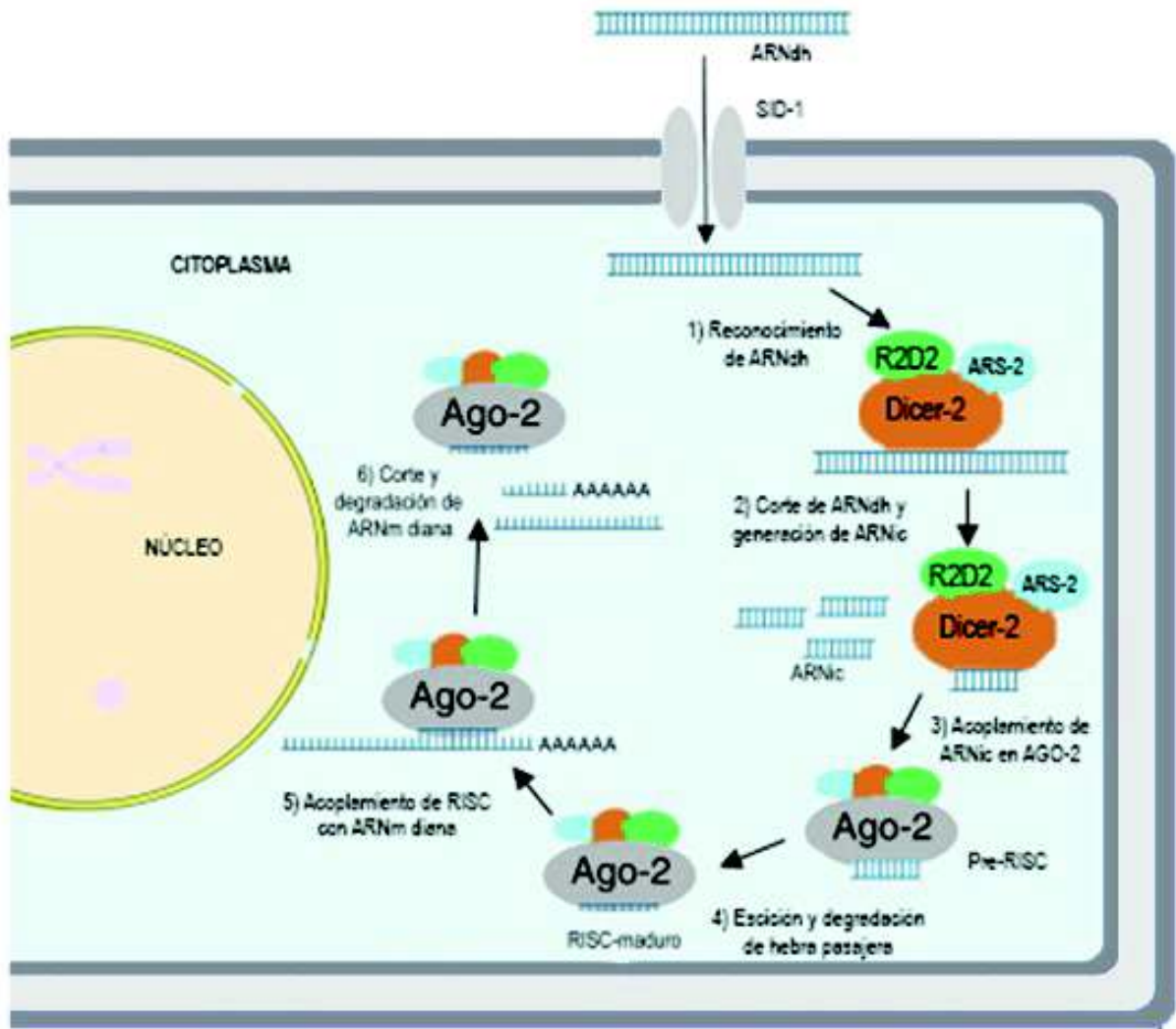


Figura 1. Mecanismo de interferencia por ARN en camarones peneidos. Ante la presencia de ARNds exógeno en el interior da la célula se lleva a cabo la activación del mecansimo ARNi. 1) La doble hélice es reconocida por Dicer-2, en conjunto con proteínas accesorias que aumentan su afinidad por la misma. 2) Dicer-2 corta el ARNds en fragmentos de ARNico de ~21 pb, pudiendo generar un *pool* o cargarlos a RISC. 3) Se lleva a cabo el acoplamiento del ARNico a Ago-2, teniendo como resultado la formación del complejo Pre-RISC. 4) Ago-2 desenrolla la doble hélice y degrada la hebra pasajera, quedando la hebra guía acoplada al complejo RISC-maduro, que cuenta con capacidad de degradar a ARNm que tengan complementariedad de bases con la hebra guía. 5) RISC interactúa con el ARNm diana por medio de la hebra guía, acoplándose a esta a través de distintos cambios conformacionales. 6) Se lleva a cabo el corte endonucleolítico del ARNm, la separación del mismo del complejo y finalmente se lleva a cabo su degradación. Modificado de Nguyen *et al.* (2016).

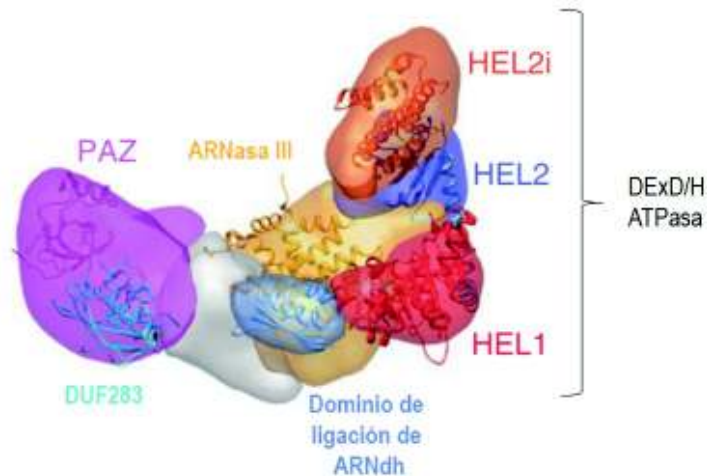


Figura 5. Esquema de la estructura de Dicer-2. En la figura se muestran los distintos dominios que conforman una enzima Dicer-2 canónica, compuesta por dos dominios ARNasa III, PAZ DUF238, DExD/H ATPasa (subdominios HEL1, HEL2 y HEL2i) y el dominio de ligación de ARNdS. El número y disposición de los dominios puede variar dependiendo de la especie. Modificado de Lau *et al.* (2012).

vez promueven la afinidad que dicha enzima tiene por el ARNdS, como la proteína codificada por el gen de resistencia a arsénico (Ars-2) y la proteína de bajo peso molecular R2D2 (Sabin *et al.*, 2009; Mierlo *et al.*, 2011; Gaur *et al.*, 2014; Trettin *et al.*, 2017).

El sitio activo de Dicer-2 está conformado por los dos dominios ARNasa III, a manera de dímero intramolecular, cada uno de los cuales corta una de las dos cadenas de ARN. Lo anterior da paso a la generación de ARNi, primordialmente de ~21 pb con 2 nt sin aparear en los extremos 3', debido a la distancia existente entre los dominios ARNasa III (Mierlo *et al.*, 2011; Prabha *et al.*, 2015). El dominio DExD/H ATPasa coadyuva en el corte de la doble cadena, pudiéndose potenciar por medio del aprovechamiento de ATP, aunque no es del todo determinante, además de monofosfatar e hidroxilar los extremos 5' y 3', respectivamente (Siomi y Siomi, 2009; Mierlo *et al.*, 2011). Se ha propuesto que la acción del dominio DExD/H ATPasa, pudiera causar cambios conformacionales que expongan dominios que puedan ser reconocidos por proteínas accesorias (Tome *et al.*, 2018).

Se ha sugerido que R2D2 tiene una importancia fundamental en el mecanismo ARNi, ya que, además de fungir como potenciador de la ligación del ARNdS al inicio de dicha cascada de

señalización, promueve la formación del complejo cargador de RISC (RLC, por sus siglas en inglés) (Liu, 2003), activando el núcleo catalítico del ARNi, RISC (Gaur *et al.*, 2014). El RLC se genera una vez que los ARNic generados por Dicer-2 son cargados en R2D2, que cuenta con 2 dominios de ligación de ARNs, Hoy en día, es sabido que Dicer-2 se une al extremo de ARNi con mayor inestabilidad termodinámica (pasajero), mientras que R2D2 interacciona con el de mayor estabilidad (guía) (Liu *et al.*, 2006b ; Kobayashi y Tomari, 2015), y se ha sugerido que la conformación del RLC pudiera exponer los 2 nucleótidos sin aparear en los extremos 3', para posteriormente acoplarlos a la proteína argonauta, miembro de RISC (Meister y Tuschl, 2004).

La familia de proteínas Argonauta está conformada por distintas enzimas especializadas en procesar diferentes clases de ARN bicatenario de cadena corta. En algunas especies de camarones, como *P. vannamei*, al igual que en otros artrópodos, existen cuando menos dos subtipos de dicha enzima, Ago-1 y Ago-2 (Bartholomay *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2016). De las anteriores, la primera procesa ARNm y la segunda está encargada de ARNic (Nguyen *et al.*, 2019). Algunas proteínas Ago tienen una estructura globular formada por dos lóbulos. El dominio N y PAZ conforman el lóbulo N-terminal, mientras que el C-terminal está constituido por los dominios MID y PIWI. Ambos lóbulos se encuentran unidos por dos regiones enlazadoras (L1 y L2). El sitio activo, también denominado rebanador (por su traducción del inglés, *slicer*), está constituido por una región del dominio PIWI con actividad ARNasa H y está localizado en la región central de la proteína (Figura 6) (Sheu-gruttadauria y Macrae, 2017). Cabe señalar que en algunos artrópodos e incluso mamíferos sólo el subtipo Ago-2 (Figura 6) cuenta con el sitio activo, de tal forma, sólo Ago-2 tiene capacidad de catalizar la degradación de ARNm por medio de corte endonucleolítico (Jinek y Doudna, 2009; Green y Weinberg, 2011).

Previo a la catálisis del ARNic, se lleva a cabo la entrega del mismo, desde R2D2, coadyudado por chaperonas Hsc70 y Hsp90, al dominio PAZ de Ago-2, conformándose el complejo conocido como pre-RISC (Meister y Tuschl, 2004; Kwak y Tomari, 2012; Macrae *et al.*, 2012). El dominio MID cuenta con una región que tiene la capacidad de interactuar con el 5'-Cap, acoplado de manera no trascendental al ARNic entre los dominios PAZ y MID (Kwak y Tomari, 2012; Green y Speck, 2018). Posteriormente, la separación de la doble hélice es mediada por el dominio N y el sitio rebanador, la hebra guía es retenida en Ago-2 y la cadena pasajero degradada debido a la actividad ARNasa H del dominio PIWI (Kwak y Tomari, 2012).

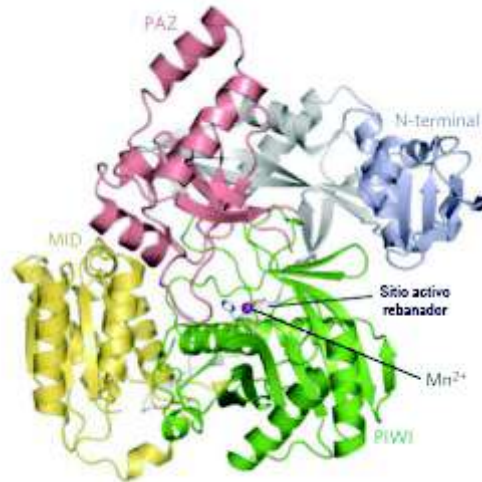


Figura 6. Esquema de la enzima Ago-2. Las proteínas Ago-2 canónicas se encuentran constituidas por los dominios PAZ, N-terminal o dominio N, MID y PIWI. El sitio activo, dependiente de iones Mg^{2+} , cuenta con actividad ARNasa H. Tomado de Jinek y Doudna (2009).

Lo anterior, da como resultado la conformación de un estado del complejo denominado RISC-maduro, que cuenta con una alta estabilidad termodinámica y con capacidad de elegir como blanco a transcritos de ARNm que tengan complementariedad de bases exacta con la hebra guía (ARNm diana), acoplada en RISC (Kobayashi y Tomari, 2015).

Recientemente, se ha propuesto que la detección y degradación del ARNm diana, por parte de RISC-maduro, se pudiera llevar a cabo por medio de la interacción de los nucleótidos de la hebra guía (g) 2 – 8 con los nt del ARNm diana (d) 2 – 8 (Cenik y Zamore, 2011; Sheu-gruttadauria y Macrae, 2017). Como se mencionó previamente, el 5-Cap se encuentra acoplado al dominio MID, g2 – g8 adquieren una conformación de hélice de cadena sencilla, mientras que el resto de la cadena se extiende por el canal central de los dos lóbulos, sin una conformación definida, hacia el dominio PAZ, que interactúa con el extremo 3'. La porción g2 – g8 es también conocida como región guía y, de esta, sólo se g2 y g4 se encuentran expuestas al solvente. De tal forma, la primera interacción entre este par de nucleótidos con d2 y d4, posterior a lo cual se da una serie de cambios conformacionales, tanto a nivel proteico como en la hebra guía, que conllevan a la adopción del resto de los nucleótidos de la misma, a una conformación tal que facilita la interacción entre ambas cadenas (Sheu-gruttadauria y Macrae, 2017). Finalmente, una

vez conformada la doble hélice, el ARNm diana es degradado mediante el corte endonucleolítico, facilitado por el sitio rebanador, del enlace fosfodiéster entre d10 y d11; desestabilizando la doble hélice (Cenik y Zamore, 2011).

II.3 Usos del Mecanismo ARNi para el Estudio y Control de Enfermedades

El ARNi fue descrito por primera vez por Fire *et al.* (1998) quienes determinaron que la inyección de ARNs en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* resultaba en una potente inhibición de la expresión de genes endógenos, lo cual se podía extender hasta la progenie de los organismos tratados. A partir de ese momento, esta metodología se ha utilizado en una gran cantidad de investigaciones, para describir la función de distintos genes (Zhou y Rossi, 2011). En estudios posteriores, Zamore *et al.* (2000) demostraron que la inhibición de la expresión de un determinado gen se daba de manera dependiente y específica a la secuencia del ARNs, así como de los ARNic producto de su catálisis, ya que el corte del ARNm se da, de manera exclusiva, dentro de la secuencia de los ~21 nt del ARNic. De tal forma, se constató que mediante el uso de ARNi se puede silenciar la expresión de prácticamente cualquier gen, ya sean de un agente patógeno o célula del organismo a tratar. Dicha investigación contribuyó al desarrollo de tratamientos terapéuticos contra diferentes enfermedades como, cáncer, síndromes autoinmunes y degenerativos, así como de origen bacteriano y viral, entre otros. (Zhou y Rossi, 2011).

Las estrategias basadas en ARNi proveen de una herramienta muy prometedora para el estudio de enfermedades de origen viral, así como la relación huésped-hospedero de un determinado agente etiológico (Johnson *et al.*, 2011; Kole *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2018). Además, el uso de ARNs para el desarrollo de vacunas, pudiera resultar en la obtención de métodos más seguros para tratar una determinada enfermedad de origen viral, en comparación con las vacunas vivas modificadas usadas comúnmente en la actualidad. Lo anterior, debido a que estas tienen un alto potencial de mutar en una forma virulenta, lo cual pudiera comprometer aún más la condición del hospedero inmunodeprimido. Mientras que, las vacunas desarrolladas a partir de ARNs sintético son más estables, y no mutan de la misma forma que las vacunas modificadas (Loy, 2014).

Una de las pocas desventajas que esta tecnología puede presentar, es el resultado potencialmente deletéreo producto del mal diseño de la sonda de ARNs, ya que, si la secuencia

no es única y específica del gen a silenciar, pudiera darse el caso del silenciamiento conjunto de genes fundamentales para la homeostasis del organismo. Resultando esto último en la obtención de fenotipos no aptos, o bien la muerte del sujeto tratado (Umbach y Cullen, 2009; Huvenne y Smagghe, 2010; Wilson y Doudna, 2013; Kalantari *et al.*, 2016)..

La existencia de una respuesta de tipo ARNi en camarones peneidos fue descrito por primera vez por Robalino *et al.* (2004) quienes determinaron que los camarones de la especie *P. vannamei* pueden ser inmunoestimulados ante la infección de WSSV y TSV, por medio de la administración de ARNds. De tal forma que, al ser tratados con ARNds no específico para cada patógeno, los camarones presentaron una mejoría en cuanto a la respuesta a la infección viral, aumentando significativamente el índice de supervivencia (50-70%) de individuos sujetos a un ensayo de reto viral. Lo anterior, pudiera sugerir que existe una relación directa entre la activación del ARNi y el sistema de respuesta inmune innato en peneidos. No obstante, Robalino *et al.* (2005) corroboraron que la administración de ARNds específico para distintos genes de cada uno de los virus mencionados previamente, promueve una respuesta mucho más efectiva ante estos patógenos, en comparación con el ARNds no específico. De manera que, mientras la administración de ARNds específico confería una protección tal que aumentaba el índice de supervivencia de a ~90% a los 11 días post inoculación (dpi), el ARNds no específico sólo retrasaba la muerte masiva de los organismos de estudios; alcanzando el 90-95% de mortalidad en el mismo período de tiempo. A partir de los dos estudios anteriormente mencionados, se ha dado un gran desarrollo en cuanto al estudio del ARNi en camarones peneidos, aplicado a la generación de estrategias antivirales, proveyendo al sector acuícola de una nueva y eficaz herramienta para responder a un brote infeccioso (Loy, 2014; Nguyen *et al.*, 2016).

Al día de hoy, en camarones peneidos, la mayor parte de las investigaciones se ha centrado en el estudio de agentes etiológicos virales como el WSSV, TSV, PstDV1 y YHV, entre otros. Para hacer frente a estos patógenos, principalmente, se han adoptado como estrategias el silenciar genes que codifican para proteínas estructurales y genes no estructurales, así como genes de las células hospederas (Krishnan *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2016). Así mismo, se han desarrollado distintos sistemas de entrega de ARNds al interior de las células, además de la entrega sistémica por medio de inyección individual, con el fin de mejorar la practicidad de la administración y efectividad del ARNds (Loy, 2014)

II.4 Métodos de entrega de ARNds

La entrega de ARNds desnudo pudiera no ser una forma efectiva de transferirlo al interior de las células diana, por lo que la actividad de éste perdura durante poco tiempo. Por lo tanto, para reducir la exposición del mismo a factores propios del organismo que pudieran degradarlo (Peng *et al.*, 2018), para mejorar la eficacia, aumentar la especificidad celular para la generación de vacunas o estrategias antivirales basadas en esta tecnología, es necesario el desarrollo de un sistema de entrega seguro y efectivo (Haq *et al.*, 2012; Haussecker, 2014; Prabha *et al.*, 2015; Sanitt *et al.*, 2016; Dana *et al.*, 2017).

Los sistemas, o vectores, de entrega de ARNds se pueden clasificar de dos formas, virales y no virales. Entre los primeros, se encuentran aquellos donde se utilizan virus modificados. En esta categoría también se pueden considerar las VLPs derivadas de proteínas de diferentes virus para encapsular ARN bicatenario (Kolliopoulou *et al.*, 2017). Por otra parte, entre los sistemas de entrega no virales se incluyen péptidos, polímeros y microorganismos que sintetizan ARNds, entre otros (Davidson y McCray, 2011; Dana *et al.*, 2017). Los métodos de entrega mencionados previamente se describen a continuación, con enfoque en aquellos que han sido utilizados en camarones peneidos.

II.4.1 Administración de ARNds Desnudo por Inyección Intramuscular

La inyección o punción subcutánea fue la primera técnica utilizada para administrar ARNds a un organismo vivo, con lo cual el ácido nucleico es captado de manera masiva por una gran cantidad de células (Fire *et al.*, 1998). Desde entonces, se ha vuelto uno de los métodos más ampliamente utilizados. Si bien este método es usado de manera convencional para probar el efecto de ARNds, a pequeña escala en sujetos de estudio, su implementación en la industria camaronícola es poco viable e impráctica. Lo anterior, debido a la necesidad de puncionar a cada uno de los camarones cultivados, de manera individual. No obstante, y a pesar de sus limitantes, se ha usado para probar la efectividad de una gran cantidad de estrategias antivirales (Loy, 2014).

En cuanto al uso de ARNds desnudo para el silenciamiento de genes propios del hospedero, un blanco comúnmente utilizado para inhibir la infección viral son los receptores celulares, utilizados por los patógenos para ingresar a la célula. No obstante, este tipo de metodologías puede tener efectos deletéreos en el sujeto de estudio, teniendo como resultado la muerte del mismo. Los receptores celulares tienen un rol fundamental en el inicio del proceso

infeccioso, ya que estos determinan el tropismo viral (Schneider-Schaulies, 2000). Sin embargo, muchos de ellos están implicados en procesos de importancia vital para las células, por ejemplo el mantenimiento de la homeostasis, por lo que su silenciamiento pudiera provocar fallos a nivel sistémico (Charoensapsri *et al.*, 2015).

Con relación a lo anterior, Senapin y Phongdara (2006) al estudiar el interactoma del TSV con las proteínas de *P. monodon*, lograron identificar al receptor laminina como una de las proteínas capaces de mediar el inicio del proceso infeccioso de dicho patógeno. En estudios posteriores, en un intento por desarrollar un método de control para el TSV, Senapin *et al.* (2010) silenciaron la expresión del receptor laminina. No obstante, lo anterior tuvo como resultado la muerte de los camarones tratados con ARNs. Por otra parte, el mismo enfoque fue utilizado por Assavalapsakul *et al.* (2014) en el caso del YHV, obteniendo resultados positivos. Para lo cual, sintetizaron ARNs específico para el receptor PmYPR65, que interactúa con proteínas estructurales del YHV al ingresar a las células hospederas. De esta forma, al silenciar la expresión de dicho receptor y someter, posteriormente, a camarones de la especie *P. monodon* a un ensayo de reto viral, obtuvieron un porcentaje de supervivencia de 95%.

Con respecto al silenciamiento de genes virales, una gran cantidad de investigaciones se han llevado a cabo al respecto. Como se mencionó previamente, lo anterior se ha abordado de dos maneras, principalmente; silenciamiento de genes estructurales y no estructurales. Los últimos han tenido un mayor uso, bajo la premisa de que los productos expresados de manera temprana son los encargados de orquestar los primeros estadios del establecimiento de una infección fructífera. No obstante, la efectividad del ARNs pudiera estar relacionada, además de la función del gen a silenciar, con la abundancia de transcritos del mismo, y esto a su vez puede depender de distintos factores, por ejemplo, la fuerza de la región promotora de dicho gen (Ho *et al.*, 2011). Lo cual, sugiere que cada caso tiene que ser evaluado de manera individual.

Tirasophon *et al.* (2005) evaluaron la efectividad del silenciamiento mediante ARNs, de distintos genes de YHV, incluidos dos estructurales (gp116 y gp64) y tres no estructurales (polimerasa, helicasa y proteasa). De esta manera, determinaron que la utilización ARNs específico para genes no estructurales, tuvo como resultado una respuesta mucho más efectiva en células Oka de *P. monodon*, particularmente con el silenciamiento de la proteasa viral. Así mismo, Yodmuang *et al.* (2006) establecieron que sólo con usar ARNs anti-proteasa YHV (25

µg), era suficiente para inhibir la replicación de este patógeno en *P. monodon*, por un tiempo mínimo de 10 dpi.

El Virus de Laem-Singh (LSNV) es un virus de ARN que se ha correlacionado con el síndrome de crecimiento lento en *P. monodon*, el cual afecta severamente a la industria camaronícola, pudiéndose dar la transmisión de manera vertical y horizontal (Flegel, 2009). De acuerdo con Saksmerprome *et al.* (2013) el genoma de dicho patógeno codifica una ARN polimerasa dependiente de ARN (ARNpol-LSNV), que pudiera ser de gran importancia para el proceso infeccioso. En este sentido, mediante la síntesis *in vitro* de ARNs específico para ARNpol-LSNV (6 µg), y su posterior administración por medio de inyección intramuscular, pudieron observar una protección contra la infección de LSNV en *P. monodon*. Este efecto tuvo una duración de al menos 10 dpi, de tal forma que, para mantener el silenciamiento de la enzima en cuestión fue necesario la administración repetitiva del ARNs. De manera similar, Saksmerprome *et al.* (2017) mediante la administración de ARNs - ARNpol-LSNV lograron disminuir significativamente la cantidad de postlarvas positivas para LSNV, producidas por hembras infectadas con el mismo virus. Lo anterior se puede deber a una abolición temporal de la transcripción del gen viral, al momento de producir cigotos, teniendo como resultado que las proteínas virales necesarias para ensamblar nuevas partículas virales no se encontraran presentes, y, por ende, no existe presencia alguna de virus en las células haploides.

El densovirus de *Penaeus monodon* (PmDENV), es un protoparvovirus que también se ha asociado al síndrome del lento crecimiento en *P. monodon*, además de generar deformaciones en individuos infectados, afectando severamente el valor comercial. De forma similar a los parvovirus, en su genoma se codifican dos proteínas no estructurales (ns1 y ns2) y una de cápside (VP). Attasart *et al.* (2010) evaluaron el efecto de la aplicación de ARNs contra las proteínas ns-1 y VP, en camarones de la especie *P. monodon* infectados experimentalmente con PmDENV. En dicho estudio, se determinó que existe una inhibición de la replicación viral, por un tiempo aproximado de 14 días. Por otra parte, Attasart *et al.* (2011) desarrollaron una estrategia antiviral en contra del PmDENV, en *P. monodon* preinfectados de manera natural. Mediante el uso de una combinación de ARNs anti ns-1 y VP, lograron disminuir el número de partículas virales a niveles casi imperceptibles, reduciendo, además, distintos efectos adversos asociados a la enfermedad, como la hipertrofia nuclear de células infectadas.

Como se mencionó anteriormente, uno de los patógenos que más seriamente afecta a la industria camaronícola es el PstDV1, causando grandes pérdidas económicas, principalmente, en el cultivo de *P. vannamei*. Ho *et al.* (2011) hicieron uso de ARNds contra la PstDV1-CP y contra una secuencia del genoma donde se traslapan el gen codificante de NS-1 y NS-2, con el fin de determinar su eficacia para prevenir la infección por parte del PstDV1 en camarones de la especie *P. vannamei*. Así, mediante la administración repetitiva (cada 3 días) de ARNds, en sujetos sometidos a un ensayo de reto viral, pudieron observar una cantidad significativamente menor en la cantidad de copias virales ($P < 0.05$), en los camarones tratados con ARNds contra PstDV1 en comparación con los del grupo control. La protección contra este patógeno tuvo una duración mínima de 10 días. Aunado a lo anterior, demostraron que este tipo de estrategias pueden fungir como un tratamiento para tratar camarones previamente infectados, al aplicarse hasta 24 h post inoculación, inhibiendo la replicación viral a lo largo del estudio.

El WSSV tiene un amplio rango de hospederos, a la fecha se han contabilizado alrededor de 98 especies, incluidas todas las especies de camarones peneidos estudiados al día de hoy (Verbruggen *et al.*, 2016). Como se mencionó anteriormente, este virus cuenta con un genoma de ADN bicatenario, con una longitud de aproximadamente 300 Kpb, en el cual se encuentran alrededor de 185 marcos de lectura abiertos (ORFs, por sus siglas en inglés), que codifican péptidos de más de 50 aminoácidos (Khadijah *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2007). Debido a lo anterior, este virus es uno de los patógenos de crustáceos más ampliamente estudiado mediante estrategias basadas en ARNi, en cuanto a la función de sus genes, las interacciones que distintos componentes virales establecen con el hospedero, así como métodos de control. De acuerdo a Musthaq y Kwang (2014), uno de los principales métodos utilizados, a manera de tratamiento terapéutico o vacuna, para el control del WSSV es el ARNds en contra de proteínas estructurales como la proteína de envoltura viral VP28, ya que éstas tienen un rol muy importante en el desarrollo del proceso infeccioso de este patógeno.

Kim *et al.* (2007) al evaluar la viabilidad del uso de ARNds como agente antiviral contra WSSV en el camarón blanco chino *P. chinensis*, estimaron la efectividad de silenciar distintos genes de dicho virus, incluidos dos estructurales (*vp28* y *vp281*) y uno codificante de una proteína-quinasa (*pk*). De tal forma, determinaron que el silenciamiento del gen *vp28* confería una protección contra la infección del WSSV que podía durar mínimamente 7 días. Los organismos inyectados con ARNds-*vp28* tuvieron un índice de supervivencia del 100%, en

contraste con aquellos que fueron tratados con ARNds-*vp281* o ARNds-*pk*, 93.3 y 53.3% respectivamente. Además, comprobaron que este tipo de tratamiento puede ser utilizado como agente profiláctico, al aplicarlo hasta 3 días antes de inocular camarones con este patógeno. De manera similar, Sarathi *et al.* (2008) obtuvieron un índice de supervivencia de 100% al inyectar intramuscularmente a camarones de la especie *P. monodon*, con ARNds-*vp28* expresado en bacterias *Escherichia coli* y someterlos a un ensayo de reto viral con el WSSV. En estudios recientes, Escobedo-Bonilla *et al.* (2015) utilizaron ARNds específico para los genes codificantes de las proteínas VP28 y VP26, así como dos genes no estructurales *orf89* y *wssv191*. Al comparar su efectividad para inmunoestimular a camarones blancos *P. vannamei*, en contra del WSSV, demostraron que los ARNds-*vp28*, -*orf89* y -*vp26* brindaban una mayor protección contra este patógeno, obteniendo índices de mortalidad de 10, 10 y 26%, respectivamente, en comparación con un 86% del grupo control.

Los tratamientos con base en la administración intramuscular de ARNds, por lo general, tienen una duración aproximada de 14 días, por lo que en la actualidad se están desarrollando nuevas tecnologías más eficientes para la entrega de ARNds (Musthaq y Kwang, 2014). Independientemente del resultado particular de cada investigación, de estas se desprende, la necesidad de un vehículo de transporte que proteja al ARNds desnudo de las condiciones propias de la hemolinfa (Shukla *et al.*, 2016),

II.4.2 Sistemas No Virales de Entrega de ARNds

La administración oral de agentes terapéuticos basados en ARNi es considerado como uno de los más favorables en cuanto a términos de costo-efectividad se refiere, aunado a que tienen una fácil forma de administración. Esta ruta provee, de manera potencial, una rápida distribución sistémica, debido a su adsorción en el intestino (González-Ballarín *et al.*, 2013). Además, esta metodología es apta para su aplicación en la industria camaronícola, ya que el tratamiento se administra en conjunto con el alimento, a su vez este es ingerido y el ARNds adsorbido a través del lumen (Loy, 2014).

Una de las estrategias más ampliamente usadas para administrar ARNds por la ruta oral en camarones peneidos, es la modificación genética de microorganismos para que puedan sobreexpresar ARNds en contra de un determinado gen. Una vez hecho lo anterior, estos microorganismos se mezclan con el alimento, mismo que se administra de manera regular a los

camarones. Así, los organismos alimentados de esta manera, adsorben el ARNs y este se disemina de manera sistémica, llegando al interior de las células, a la vez que confiere la capacidad de silenciar un determinado gen. En sí, los microorganismos fungen como protección parcial del ARNs al medio del agua marina y otros factores (Loy, 2014). Sarathi *et al.* (2008) transformaron bacterias *E. coli* HT115(DE3) para sobreexpresar ARNs-*vp28*, posteriormente recubrieron alimento peletizado comercial con dichas bacterias y alimentaron especímenes de *P. monodon*. Después de someter a los organismos tratados a un ensayo de reto viral con WSSV, obtuvieron un índice de supervivencia de 68%, en comparación con un 100% del grupo control. Además, al comparar el alimento mencionado anteriormente, con alimento recubierto con ARNs-*vp28* complejo con nanopartículas de quitosano, el grupo tratado con el último sólo logró un índice de 37% de supervivencia. Por el contrario, Sellars *et al.* (2011) al alimentar a camarones *P. monodon* con ARNs contra el Virus asociado a las Branquias (GAV, por sus siglas en inglés), así como contra el gen endógeno actina, no lograron silenciar los genes antes mencionados. No obstante, la administración de estos ARNs bicatenarios mediante inyección intramuscular, fue suficiente para silenciar la expresión de los mismos. Lo que pudiera sugerir que no todas las especies son aptas para ser inmunoestimuladas por este método.

Estudios similares fueron llevados a cabo por Attasart *et al.* (2013) quienes reportaron que al alimentar camarones *P. vannamei* y *P. monodon* con bacterias modificadas para expresar ARNs específico para los genes *Rab7* y *STAT*, por un tiempo de 6 días, tenía como resultado la abolición de la expresión de ambos genes. Cabe señalar que, dicho efecto se presentó de manera sistémica, no sólo en un órgano determinado. De la misma manera, Sanitt *et al.* (2014) silenciaron la expresión del gen *Rab7* en *P. vannamei*, mediante la alimentación de los mismos con bacterias *E. coli* productoras de ARNs-*Rab7*. Al someter a los especímenes a un ensayo de reto viral observaron una protección contra la infección por parte del YHV, con un 80% de supervivencia.

Los lípidos catiónicos son moléculas anfipáticas que se han desarrollado para fungir como sistemas de entrega de ácidos nucleicos. Estas moléculas consisten de una cabeza hidrofílica acopladas a cadenas hidrocarbonadas, o bien a derivados de colesterol. Las mismas, pueden adoptar distintas conformaciones una vez que son resuspendidas en un medio acuoso, formando un liposoma. Debido a la composición lipídica de la superficie del liposoma, pueden

interaccionar de manera electrostática con los ácidos nucleicos, por lo que pueden funcionar como vehículo de transporte de éstos al interior de las células (Shim *et al.*, 2013).

Este tipo de partículas han sido utilizadas de distintas formas, tanto inyectadas como entregadas por vía oral, entre otras (Kim *et al.*, 2008; Shim *et al.*, 2013; Sanitt *et al.*, 2016). Apiratikul *et al.* (2013) reportaron que al administrar liposomas catiónicos ligados a ARNs contra el receptor PmYPR65 a camarones *P. vannamei*, mediante inyección intramuscular, obtuvieron un índice de supervivencia de 100%, una vez que se retaron los organismos con el YHV, dicha protección tuvo una duración de 14 días. Por otra parte, Sanitt *et al.* (2016) hicieron uso de ARNs-*Rab7* encapsulado en un liposoma catiónico derivado del colesterol. Por medio de una mezcla de dicho liposoma con alimento comercial, alimentaron a camarones *P. vannamei* y posteriormente los sometieron a un ensayo de reto viral con el virus anteriormente mencionado, obteniendo un índice de supervivencia de 50% una vez transcurridos 60 dpi, en contraste con un 10% logrados mediante la inyección de ARNs-*Rab7* desnudo. Lo cual sugiere, que mediante la encapsulación de ARNs se puede alargar la longevidad del mismo, protegiéndolo de la degradación enzimática.

No obstante, a pesar de que los resultados obtenidos por medio de estrategias de entrega oral de ARNs pudieran resultar prometedores, en algunos casos no se logra el efecto esperado, sugiriendo que no es un sistema apto para todas las especies (Gaur *et al.*, 2014). El tracto digestivo es un epitelio especializado en la degradación de macromoléculas y asimilación de los productos obtenidos, a la vez que restringe el transporte de patógenos. Estos procesos, por lo general, dificultan la integridad y adsorción de agentes terapéuticos (González-Ballarín *et al.*, 2013). De tal forma que, la exposición del sistema de entrega de ARNs, a condiciones de pH no aptas, aunado a la existencia de una alta actividad enzimática, pudiera llegar a degradar al sistema mismo o parte del ARN bicatenario (Gaur *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2016; Álvarez-Sánchez *et al.*, 2017). Aunado a lo anterior, si bien este tipo de métodos pudieran generar mejores resultados que la utilización de ARNs desnudo, los sistemas desarrollados, por lo general, promueven una entrega sistémica del cargamento. Generalmente, los sistemas de entrega no virales son considerados menos eficientes que los sistemas virales (Kolliopoulou *et al.*, 2017).

II.4.3 Métodos Virales de Entrega de ARNs

El uso de virus modificados genéticamente para la entrega de distintas biomoléculas al interior de células, tanto *in vitro* como *in vivo*, se ha utilizado de manera extensa para el tratamiento de enfermedades y afecciones de distintas índoles en mamíferos, plantas, artrópodos, organismos de interés acuícola e incluso humanos (Roy y Noad, 2008; Merten y Gaillet, 2016; Ni *et al.*, 2016). Entre los virus más ampliamente usados se encuentran los alfavirus, lentivirus, retrovirus y virus adenoasociados, entre otros. No obstante, como se mencionó anteriormente, la utilización de virus conlleva un gran riesgo, ante la posibilidad que estos puedan mutar en una variante patogénica y comprometer la salud del sujeto tratado (Nayerossadat *et al.*, 2012; Loy, 2014; Mohsen *et al.*, 2017). Un ejemplo de lo anterior, fue el caso del virus de la enfermedad de pie y boca (FMDV, por sus siglas en inglés). El FMDV provoca una enfermedad contagiosa que afecta especies de interés pecuario. Para este patógeno se formuló una vacuna a partir de virus atenuados, lo cual tuvo como resultado colateral el resurgimiento de brotes de FMDV en años posteriores a su utilización (Loy, 2014). Una opción a este tipo de tratamientos es la utilización de partículas pseudovirales, para encapsular una biomolécula de interés (Roy y Noad, 2008; Ni *et al.*, 2016; Mohsen *et al.*, 2017).

II.4.3.1 Partículas Pseudovirales como Vehículos de Entrega

Las VLPs son arreglos tridimensionales vacíos derivados de proteínas de cápside o envoltura de virus nativos (Figura 7), que pueden ser expresadas en células eucariotas o procariotas, y que, al encontrarse los elementos proteicos necesarios presentes en un medio acuoso, por lo general, se autoensamblan de manera tal que su estructura se asemeja de manera mimética a la del virus nativo; conservando el tropismo y su antigenicidad (Garcea y Gissmann, 2004; Zdanowicz y Chroboczek, 2016; Forouhar-Kalkhoran, 2017). Además, al carecer de ácidos nucleicos virales, no son patogénicas y a la vez pueden inmunoestimular por sí mismas a un determinado organismo al cual se le administren, provocando una fuerte respuesta inmune (Roy y Noad, 2008; Kushnir *et al.*, 2012; Shirbaghaee y Bolhassani, 2016).

Las VLPs, así como la cápside o envoltura de los patógenos de los que se derivan, conforman la cubierta proteica los virus. Dichas partículas están formadas por subunidades proteicas oligoméricas, también llamadas capsómeros (Xue *et al.*, 2014; Shirbaghaee y Bolhassani, 2016; Zdanowicz y Chroboczek, 2016; Forouhar-Kalkhoran, 2017). Los últimos

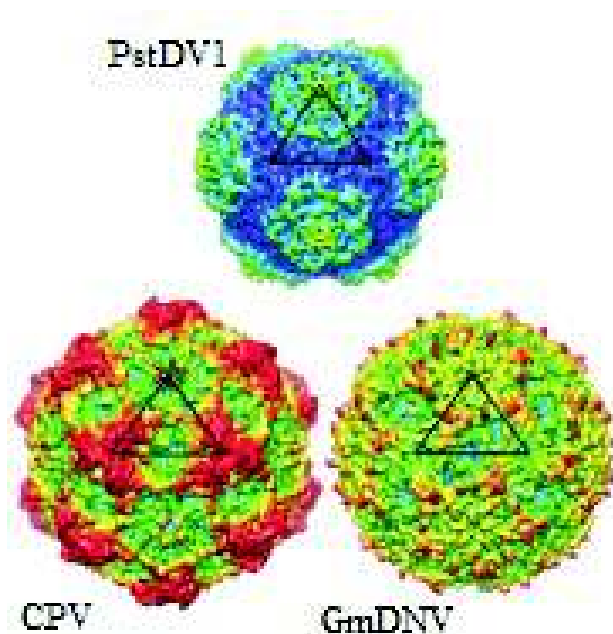


Figura 7. Esquema de las cápsides de distintos parvovirus. PstDV1, *Penstydensovirus* de decápodos 1; CPV *Protoparvovirus* de carnívoros (parvovirus canino); GmDNV, *Galleria mellonella Densovirus*. Modificado de Kaufmann *et al.* (2010).

interactúan entre sí para la formación de la cápside misma, mediante distintos tipos de interacciones proteína - proteína, como, fuerzas de Van der Waals, puentes disulfuro, interacciones iónicas, interacciones hidrofóbicas y enlaces covalentes, entre otras (Ni *et al.*, 2016; Zdanowicz y Chroboczek, 2016). Dependiendo del acomodo o arreglo espacial de los capsómeros, las cápsides pueden adoptar estructuras helicoidales icosaédricas o complejas (Xue *et al.*, 2014; Forouhar-Kalkhoran, 2017).

Las partículas pseudovirales tienen la capacidad de interactuar con otras biomoléculas. Por lo general, distintos residuos de naturaleza básica y carga positiva se encuentran orientados hacia el interior de la cápside misma, por lo que estas pueden fácilmente encapsular moléculas de carga apropiada, interactuando mediante fuerzas electrostáticas (Garcea y Gissmann, 2004; Xue *et al.*, 2014). Además, como se mencionó anteriormente, debido a que las VLPs conservan la estructura propia del virus del cual se derivan, mantienen el tropismo del mismo, pudiendo interactuar con receptores celulares específicos e ingresar, de manera exclusiva, a aquellas

células que tengan expuestos en su membrana los receptores necesarios para interactuar con los antígenos virales que se encuentran la cápside recombinante. Las VLPs, al igual que los virus, tienen la capacidad de ingresar a las células diana mediante distintos mecanismos celulares, tales como la endocitosis (Erbacher *et al.*, 1999; Georgens *et al.*, 2005; Seow y Wood, 2009).

Si bien las VLPs conservan el tropismo de los virus nativos, estas pueden ser modificadas, para presentar en su superficie diferentes tipos de moléculas, péptidos e incluso epítopes de distintos virus. Este tipo de arreglos o “decoraciones”, se llevan a cabo mediante uniones covalentes, modificación química y modificación de la secuencia del gen codificante de las proteínas estructurales que conforman la cápside. Lo anterior, puede conllevar al cambio del tropismo de la VLP, o bien se realiza con el fin de la presentación de antígenos, para inmunoestimular un determinado organismo. Este tipo de partículas, es denominado VLP quimérica (Schwarz y Douglas, 2015; Shirbaghaee y Bolhassani, 2016; Forouhar-Kalkhoran, 2017).

Debido a las características inherentes de estas partículas, han sido ampliamente utilizadas para la presentación de antígenos de distintas índoles, fungiendo como vacunas, principalmente en mamíferos y humanos, así como tratamientos experimentales en organismos de interés acuícola (Roy y Noad, 2008; Musthaq y Kwang, 2014; Merten y Gaillet, 2016; Xie y Xu, 2017). Así mismo, se ha hecho uso de las VLPs como agentes terapéuticos para tratar distintas enfermedades, a manera de vehículos acarreadores. Las VLPs recombinantes de distintos virus han servido como plataforma de entrega altamente eficientes, de medicamentos y biomoléculas, como otras proteínas, péptidos y ácidos nucleicos, entre otros, (Garcea y Gissmann, 2004; Oliveira *et al.*, 2006; Ashley *et al.*, 2011; Shirbaghaee y Bolhassani, 2016).

Entre las VLPs recombinantes que han sido utilizadas para los fines antes mencionados se encuentran las derivadas de poliomavirus, parvovirus, picornavirus, el virus de la hepatitis B (HbV, por sus siglas en inglés), el virus de moteado clorótico (CCMV, por sus siglas en inglés) y virus del mosaico del caupí (CPMV, por sus siglas en inglés), así como los bacteriófagos MS2, Q β y *Salmonella typhimurium* P22, entre otros (Singh *et al.*, 2006; Teunissen *et al.*, 2013; Shirbaghaee y Bolhassani, 2016; Rohovie *et al.*, 2017). A su vez, el uso de estas partículas ha tenido un gran auge para tratar diversas condiciones en una amplia gama de organismos, incluyendo humanos, plantas y mamíferos de interés pecuario, así como organismos de interés acuícola, entre otros (Shirbaghaee y Bolhassani, 2016). Por ejemplo, se han desarrollado

tratamientos potenciales en humanos contra enfermedades virales, bacterianas, enfermedades degenerativas y cáncer (Seow y Wood, 2009; Forouhar-Kalkhoran, 2017). Así, uno de los usos que se les ha dado, es como vehículos acarreadores de genes (Ni *et al.*, 2016).

Chen *et al.* (2010) mediante el uso de VLPs formadas por la proteína VP1 del Virus John Cunningham (JCV, por sus siglas en inglés) transfectaron células de carcinoma de colon (COLO-320 HSR) con ADN exógeno, codificante para la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) y la timidina cinasa del virus del herpes simple (TK). Primeramente, demostraron que la VLP del JCV cargada con GFP, al ser inyectada en ratones vivos, a los cuales se les implantaron células de carcinoma de colon, se encontraba localizada solamente en las células tumorales. Posteriormente, repitieron el experimento usando la VLP cargada con TK, para después administrar el fármaco ganciclovir. Después de aplicar este tratamiento en ratones modificados, pudieron observar que la replicación de las células tumorales se inhibió a niveles casi nulos, no resultando afectadas otro tipo de células. Los resultados de este estudio indican que las VLPs tienen una alta especificidad, debido a que estas partículas sólo penetraron en este tipo de células, consistente con el tropismo del virus nativo. Resultados similares fueron obtenidos por Chao *et al.* (2018) al utilizar el mismo sistema (VLPs-JCV, GFP, TK y ganciclovir) en ratones a los que se le implantaron células de glioblastoma.

Se ha hecho uso de las VLPs para el silenciamiento de genes por medio del ARNi. Hoffmann *et al.* (2016) utilizaron una VLP derivada de la proteína VP1 del JCV, para encapsular ARNic contra el gen activador del receptor para el ligando NF-kB (RANKL, por sus siglas en inglés). Lo anterior, con el fin de reducir el número de transcritos RANKL, ya que se ha relacionado con el inicio de la osteoporosis, y de tal manera retardar la aparición de esta enfermedad. Como resultado de este estudio, se obtuvo un decremento significativo en el número de transcritos del gen RANKL en osteoblastos de ratas, lo cual sugiere que la VLP del JCV fue capaz de ingresar a estas células liberando el ARNic-RANKL. Con lo anterior se demostró que las VLPs cargadas con ARNic pueden liberar el cargamento en el interior de las células, lo que tuvo como consecuencia la activación del ARNi, teniendo como resultado el silenciamiento del gen de interés. Por ende, este tipo de sistema de entrega pudiera fungir como un agente terapéutico contra la osteoporosis. Así mismo, podría sugerir que pueden ser usadas para entregar ARNs para silenciar genes de interés en otros tipos de células y/o especies de organismos.

Como se mencionó anteriormente, en la última década se han desarrollado métodos experimentales para inmunoestimular especies de interés acuícola. Al día de hoy, se han desarrollado pocas VLPs derivadas de virus que infecten crustáceos, entre estas se encuentran las cápsides recombinantes del virus extra diminuto (XSV, por sus siglas en inglés) (Wang *et al.*, 2008), PmDNV (Sinnuengnong *et al.*, 2017), PstDV1 (Hou *et al.*, 2009) y el nodavirus *Macrobrachium rosenbergii* (MrNV) (Goh *et al.*, 2011). De las anteriores, solamente dos han sido estudiadas con enfoque a la utilización de las mismas como vehículo de entrega de biomoléculas, obteniéndose resultados prometedores. De manera posterior al desarrollo de la VLP del MrNV por Goh *et al.* (2011) se reportó que dichas partículas podían encapsular ADN plasmídico, además de tener la capacidad de interactuar con células diana, además de poder liberar el ácido nucleico en cuestión (Jariyapong *et al.*, 2014). Posteriormente, Jariyapong *et al.* (2015a) reportaron el encapsulamiento de ARNds-*vp28* de WSSV en VLPs de MrNV, y comprobaron que estas partículas ingresan a varios tejidos, en los cuales estimulan la activación del ARNi. Además, determinaron que la VLP funge como protección del ARNds encapsulado, resistiendo a la acción de enzimas digestivas. De manera similar, Jariyapong *et al.* (2015b) demostraron que la utilización de las VLPs de MrNV cargadas con ARNds-*vp28*, es una herramienta efectiva contra la infección del WSSV. Después de la administración de esta partícula en camarones infectados con dicho patógeno, observaron una disminución significativa de transcritos del gen *vp28*. Aunado a lo cual, obtuvieron un índice de supervivencia de 44.5% a los 7 dpi, en contraste con el grupo control, alcanzando una mortalidad del 100% en el mismo lapso de tiempo.

Las VLPs del PstDV1 fueron desarrolladas por Hou *et al.* (2009) al sobreexpresar la PstDV1-CP en el sistema *E. coli*. Además, determinaron que estas partículas son capaces de ingresar a las células diana, por lo que sugirieron que podrían ser utilizadas como vehículos acarreadores de moléculas con actividad biológica. Lo anterior, fue corroborado por Kiatmetha *et al.* (2018) al transfectar el gen de la GFP, contenido en VLPs del PstDV1, en camarones de la especie *P. vannamei*, obteniendo como resultado, la localización de las cápsides recombinantes cargadas en células de branquias y de tejido muscular, lo cual detectaron por medio de emisión de fluorescencia. Además, determinaron que estas partículas resistían la acción de enzimas digestivas tales como, tripsina y quimiotripsina, y en menor medida a pepsinas. Aunado a lo anterior, al evaluar la estabilidad de las mismas en condiciones extremas,

comprobaron que pueden permanecer viables en un amplio rango de pH (4 - 9), además de presentar una degradación mínima a 4°C por un período de tiempo de 30 días. Así, comprobaron que las VLPs derivadas de este patógeno pueden fungir como vehículos acarreadores al interior de células diana, a la vez que pueden liberar las moléculas contenidas en su interior, protegiendo el ácido nucleico encapsulado de condiciones que, de otro modo, degradarían el ARNs (Álvarez-Sánchez *et al.*, 2017). Adicionalmente, estos hallazgos pudieran sugerir que, al no ser necesarias temperaturas de congelación, y debido a su gran estabilidad en condiciones extremas, las VLPs derivadas del PstDV1 podrían ser utilizadas como una vía de administración de ARNs compatible con la camaronicultura.

En estudios recientes, Sinnuengnong *et al.* (2018) reportaron la entrega de ARNs contra la proteasa de YHV, cargado en la VLP del PstDV1, como un método para el control del YHV. Para lo cual, coexpresaron las cápsides recombinantes del PstDV1 y el ARNs-proteasa en *E. coli*, teniendo como resultado la encapsulación del ARN bicatenario en las VLP, una vez que estas se autoensamblaron. Posteriormente, a especímenes del camarón blanco se les administró la VLP cargada vía inyección intramuscular con ARNs-proteasa 7 días previos a la infección de estos con YHV, obteniendo como resultado un índice de supervivencia de 70%, mientras que los que fueron inyectados con ARNs desnudo alcanzaron un 100% de mortalidad, al igual que los del grupo control. Así, se demostró que las VLPs del PstDV1, tienen un alto potencial para ser utilizadas como agentes terapéuticos contra agentes etiológicos de origen viral. A la vez que pueden proteger al ARNs encapsulado, alargando su longevidad y, por ende, la duración de la protección otorgada mediante el silenciamiento del gen de interés.

No obstante, las cápsides recombinantes plegadas *in vivo*, dentro del sistema de expresión, suelen contener en su interior ARN bacteriano (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012), pudiendo comprometer al organismo a tratar; requiriendo por lo general pasos adicionales para su eliminación que pudieran comprometer la integridad del ARNs encapsulado. Además, la expresión de ARNs en un sistema que cuenta con actividad ARNasa III, como es el caso del último estudio mencionado, conlleva a la degradación del ácido nucleico, por lo que la cantidad del ARN bicatenario podría ir en detrimento. Aunado a lo anterior, este tipo de encapsulación promueve la interacción del ARNs tanto con el interior, como la superficie de la VLP, con lo cual, la fracción asociada con el exterior pudiera ser fácilmente degradada por acción de nucleasas (Sinnuengnong *et al.*, 2018). De esta forma, a pesar de lo conveniente que pudiera

resultar esta estrategia para la entrega de ARNds, son necesarios más estudios para optimizar dicho sistema.

Como es sabido, la camaronicultura tiene una gran importancia en el panorama mundial, como fuente de trabajo, ingresos y alimentos. Probablemente, el principal factor por el cual la producción camaronícola ha ido en detrimento, es el grave impacto que tienen los brotes de enfermedades provocadas por virus, provocando eventos de mortalidades masivas, entre los cuales el WSSV representa la mayor amenaza para el cultivo de camarones peneidos. Como se ha mostrado hasta este punto, es evidente como el uso de ARNds para silenciar un determinado gen, puede fungir como tratamiento terapéutico contra distintas enfermedades, incluidas las de origen viral. De esta manera, el silenciamiento de un gen estructural blanco de gran importancia, mediante ARNds, pudiera resultar crítico para el control del WSSV. No obstante, los métodos convencionales para la administración del mismo, son ineficaces y poco aplicables a gran escala. En este sentido, las VLPs pudieran representar una alternativa viable para la administración efectiva y selectiva de ARNds en contra de agentes etiológicos de importancia, como lo es el WSSV. Así, debido a su gran estabilidad en condiciones extremas, aunado a que estas partículas pueden ingresar a las células diana del WSSV (hemocitos), las VLPs derivadas del PstDV1 resultan de especial interés para dicho fin. Por lo anteriormente expuesto, el propósito de esta investigación es el desarrollo de una nanoplataforma de encapsulación de ARNds contra VP28, basada en las VLPs del PstDV1, aplicable en el desarrollo tratamiento terapéutico potencial para el control del WSSV.

III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Será posible encapsular ARNs en partículas pseudovirales del *Penstyldensovirus* de decápodos 1 ensambladas *in-vitro*?

IV. HIPÓTESIS

Si las partículas pseudovirales (VLPs) de distintos virus poseen características químicas que les confieren la capacidad de albergar diversas moléculas en su interior, las VLPs del *Penstyldensovirus* de decápodos 1 ensambladas *in-vitro* tendrán la facultad de encapsular ARNs.

V. OBJETIVOS

V.1 Objetivo General

- Desarrollar una nanoplataforma de encapsulación de ARNs contra el virus del síndrome de la mancha blanca, a partir de VLPs recombinantes del *Penstyldensovirus* de decápodos 1.

V.2 Objetivos Particulares

- Sintetizar y purificar VLPs recombinantes a partir de la expresión heteróloga de la proteína de la cápside del *Penstyldensovirus* de decápodos 1.
- Sintetizar ARNs específico para el gen *vp28* del virus del síndrome de la mancha blanca
- Desarrollar un método de encapsulación de ARNs en VLPs recombinantes del *Penstyldensovirus* de decápodos 1

VI. METODOLOGÍA

VI.1 Sobreexpresión y Purificación de la Cápside del PstDV1

El protocolo de sobreexpresión de la CP del PstDV1 se llevó a cabo conforme a lo establecido por Gómez-Yanes (2017). El gen sintético que codifica la CP del PstDV1 (GenBank: AF273215), inserto en el vector pJexpress414, lo sintetizó la empresa DNA2.0 (Menlo Park, CA). Este gen sintético incluyó una etiqueta 10 His-tag en el extremo N-terminal. El plásmido se utilizó para transformar bacterias *Escherichia coli* Rosseta 2 (DE3) (Novagen), mediante choque térmico. La inserción correcta del plásmido se corroboró por secuenciación. Se lisaron las bacterias por ultrasonificación y se purificó la proteína recombinante utilizando cromatografía de exclusión de peso molecular (SEC, por sus siglas en inglés).

VI.1.1 Transformación bacteriana

Las células Rosseta 2 se resuspendieron por agitación. Posteriormente, en un vial se mezclaron 50 µL de bacterias y 20 ng de ADN plasmídico (ADNp). Después, se utilizaron tres condiciones de incubación. Primeramente, se incubó por 10 min en hielo, seguido de 30 s a 42°C, y, finalmente, se colocó el vial en hielo por 2 min. A continuación, se adicionaron 250 µL de medio SOC (0.5% extracto de levadura, 2% Triptona, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucosa), y la muestra se incubó a 30°C por 60 min, con agitación orbital constante a 250 rpm. Se realizó un sembrado masivo en placas de Petri, conteniendo agar LB (1.5% agar, 1% triptona, 0.5% extracto de levadura, 0.171 M NaCl) con 100 µg/mL de ampicilina, utilizando para ello 100 µL del inóculo antes obtenido, y se incubó, de forma invertida, a 37°C durante la noche.

VI.1.2 Sobreexpresión de la PstDV1-CP

Se realizó la selección de las colonias transformadas con éxito. A continuación, se inoculó una colonia seleccionada en 25 mL de medio LB líquido (1% triptona, 0.5% extracto

de levadura 0.171 M NaCl) con 100 µg/mL de ampicilina (LBamp), y se incubó a 37°C con agitación a 225 rpm durante 19 h. Posteriormente, el total del volumen anterior se mezcló con 1 L de LBamp y se incubó a 37°C con agitación a 225 rpm, hasta llegar a una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de 0.6. Una vez hecho lo anterior, se añadió isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, por sus siglas en inglés), a una concentración de 0.2 mM. Se incubó a 25°C con agitación a 225 rpm por 21 h. Finalmente, se centrifugó la suspensión bacteriana a $13,000 \times g$ por 30 min, se descartó el sobrenadante, y el precipitado se almacenó a -80°C.

VI.1.3 Solubilización de cuerpos de inclusión

El proceso de solubilización consistió en tres etapas secuenciales: dos de lavado (lavado 1 y lavado 2) y una de extracción, en ese mismo orden. En cada etapa se utilizó una solución diferente, siendo estas: solución de lavado 1 (50 mM Tris-HCl, 2% Triton x-100, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 7.9), solución de lavado 2 (50 mM Tris-HCl y 5 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 7.9) y solución de extracción (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 8 M urea, pH 7.9), respectivamente. Primeramente, para el lavado 1, en un tubo Falcon de 50 mL se depositaron 3 g de biomasa bacteriana, producto del proceso de sobreexpresión de la PstDV1-CP, y se agregaron 12 mL de solución de lavado 1. A continuación, la muestra se homogeneizó en hielo utilizando un ultrasonido Branson® S-450, mediante 4 pulsos de 10 s con pausas de 20 s (amplitud de 20 %). A continuación, la muestra se centrifugó a $22,000 \times g$ por 30 min a 4°C, y el sobrenadante se descartó, repitiendo el procedimiento a partir del precipitado. Una vez hecho lo anterior, se procedió con las etapas subsecuentes, para las cuales se siguió el procedimiento antes mencionado. Después, se cuantificó la concentración proteica por espectrofotometría a 260 nm, en un espectrofotómetro Nanodrop lite (Thermo Scientific). Finalmente, la muestra se almacenó a -80°C.

VI.1.4 Replegamiento de la PstDV1-CP en cuerpos de inclusión

Para dicho fin, se utilizó la solución TMNA (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM $CaCl_2$, 0.5 M arginina, 2.71 M $C_3H_5(OH)_3$, pH 7.9), la cual se ajustó a tres distintas concentraciones de urea (6, 4 y 2 M). El proceso de diálisis se realizó en cuatro etapas, primeramente, se colocó el producto de la solubilización de cuerpos de inclusión en una membrana de diálisis Spectra/Por 3 (Spectra) y se dializó contra la solución TMNA 6 M urea,

con agitación, por un tiempo de 2 h y a 4°C. Subsecuentemente, se cambió el buffer de diálisis por TMNA 4 M urea, seguido de dos recambios más con TMNA 2 M urea. Posteriormente, se diluyó el dializado por goteo, 1:1 con solución TMNA (libre de urea) en dos ocasiones, hasta llegar a un volumen de 32 mL de 0.5 M urea. Se concentró la muestra mediante un Amicon (Millipore) de 10 kDa, hasta un volumen de 6.5 mL, se determinó la concentración proteica, antes y después de concentrar, por espectrofotometría a 260 nm en un espectrofotómetro Nanodrop lite (Thermo Scientific).

VI.1.5 Precipitación con sulfato de amonio

Para determinar la cantidad de sulfato de amonio a utilizar, se utilizaron las tablas propuestas por Wood (1976). El protocolo se llevó a cabo con agitación constante, en un baño de hielo, en cada caso el sulfato de amonio se agregó de manera paulatina, procurando la completa disolución del mismo. Una vez que la muestra se saturó a la concentración deseada, se mantuvo en agitación constante durante 30 min. Posteriormente, la muestra se centrifugó a $22,000 \times g$ por 30 min, y el precipitado se almacenó a -20°C y se procedió a aumentar la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ del sobrenadante. La muestra se fraccionó llevando la solución a una concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 20, 40 y 60%. Las proteínas presentes en cada fracción se resuspendieron en 5 mL de buffer TMNA y se visualizaron mediante SDS-PAGE al 12%.

VI.1.6 Cromatografía de exclusión por peso molecular

La purificación se llevó a cabo mediante SEC, lo cual se realizó en un sistema ÄKTA y una columna cromatográfica Hi Prep S-300HR (GE Healthcare). Se utilizaron 1.5 volúmenes de columna (510 mL) de agua MilliQ para desplazar etanol fuera de la columna, seguido de 1.5 volúmenes de columna de solución TMNA para equilibrar la misma, en ambos casos se usó un flujo de 1.3 mL min^{-1} . A continuación se utilizaron 1.5 volúmenes de columna de TMNA, con flujo de 0.4 mL min^{-1} , para realizar la elución de las proteínas en solución; se colectaron fracciones de 7.5 mL. Se colectaron en pools las fracciones 13-17, 25-27, 32-35, y 36-38. Las fracciones recolectadas se concentraron utilizando filtros Amicon (Millipore) de 100, 50 o 10 kDa, hasta un volumen de 5 mL, uno por cada pool. Finalmente, las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE al 12%, el gel se tiñó con azul de Coomassie y se visualizaron por medio

del fotodocumentador Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad). Se añadió glicerol estéril hasta una concentración de 40% y las muestras se almacenaron a -20°C

VI.1.7 Ultracentrifugación con gradiente de sacarosa

Posterior a la SEC, se separaron 6.616 mg de las proteínas contenidas en el pico 1 mediante un gradiente de sacarosa discontinuo. Para lo cual se utilizó buffer TMNAs (10-70 % (W/V) sacarosa, 150 mM NaCl, 50 mM Tris.HCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 0.5 M arginina, pH 7.9). El gradiente se preparó en tubo Quick-Seal de 3.9 mL (Beckman Coulter) y consistió en siete fracciones de concentración ascendente de sacarosa (10-70%), con aumentos de 10% entre cada uno. Esta muestra se ultracentrifugó a 180,000 × g por 1.5 horas, cada fracción se recuperó mediante punción lateral. La muestra obtenida se analizó por medio de SDS-PAGE en un gel al 12% de poliacrilamida, se tiñó con azul de Coomassie, y se visualizó por medio del fotodocumentador Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad). Una vez que se analizó el gel, distintas bandas de interés se escindieron del gel y se depositaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL, conteniendo 150 µL de agua Milli Q estéril y se almacenaron a -80°C. Las bandas encontradas en la fracción de 70% de sacarosa se escindieron del gel y se almacenaron a -80°C para su posterior análisis. La identificación de proteínas por medio de espectroscopia se realizó en la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca.

VI.1.8 Identificación de proteínas recombinantes

Para identificar las proteínas recombinantes purificadas se utilizó la metodología Western-blot. La muestra se analizó por medio de SDS-PAGE al 12%. El gel obtenido y una membrana de nitrocelulosa se incubaron en buffer de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina, 10% metanol) por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, el gel se electrotransfirió a la membrana de nitrocelulosa, por medio de un sistema Trans-Blot SD semi-dry transfer cell (Bio-Rad), a 15 volts constantes. Se incubó la membrana en buffer de bloqueo (137 mM NaCl, 20 mM Tris, 0.1% Tween 20, 5% w/v leche en polvo desgrasada) por 1 h, una vez bloqueada la membrana, el gel se lavó con buffer PBST (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4). A continuación, la membrana de nitrocelulosa se incubó en una solución con el anticuerpo monoclonal Anti-His tag (Novagen) a una concentración de 1:2,000, por 1 h. Después, se incubó en el anticuerpo anti-IgG peroxidado (Sigma-Aldrich) a

una concentración de 1:7,500, por 1 h. Se realizaron cinco lavados de 5 min con agua Milli Q. La membrana se escurrió cuidadosamente y se bañó en una solución 1:1 de peróxido:luminol, y posteriormente se incubó por 10 min a temperatura ambiente. El revelado se llevó a cabo en un cuarto oscuro, utilizando para ello papel de radiografía. Se sobrepuso la membrana tratada con el papel de radiografía y se expuso por 5 min, posteriormente la membrana se sumergió por solución reveladora Gbx por 10s, seguido de agua Milli Q por 10 s, después solución fijadora por 10 s y finalmente agua Milli Q por 10 s más.

VI.1.9 Microscopía electrónica de transmisión

Una vez purificada la cápside del PstDV1, y para corroborar el correcto ensamble de la cápside, se procedió a visualizar la muestra mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés). Para esto, se utilizó un microscopio de transmisión de electrones JEOL JEM-2010F, en el Laboratorio de Biofísica del Departamento de Física de la Universidad de Sonora. Así mismo, se analizó una alícuota del inóculo viral obtenido previamente, con el propósito de comparar la morfología de la cápside recombinante con la del virus nativo. Para esto, se agregaron 10 μ L de muestra a una rejilla de cobre recubierta con una película de carbono, con un tamaño de malla de 200, y se incubó por 20 min. Posteriormente, se agregaron 10 μ L de $H_3PW_{12}O_{40}$ (ácido fosfotúngstico) al 1% y se incubó por 2 min a temperatura ambiente. Después, se colocó la rejilla en un tubo de 1.5 mL y se selló con parafilm. Previo a su visualización, las muestras se colocaron al vacío por 24 h. En análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el software Gatan Microscopy Suite.

VI.1.10 Microscopía de fuerza atómica

Se depositaron 10 μ L de muestra en el centro de una mica PELCO de 9.9 x 0.21 mm (Ted Pella). Con el fin de dispersar la muestra de manera uniforme sobre la superficie de la mica, esta se centrifugó a 3,500 rpm mediante un Spin Coater (ACE-200). Finalmente, se escaneó la muestra por medio de un microscopio de fuerza atómica Bruker-Veeco, el cual se encuentra ubicado en el laboratorio NICDET en las instalaciones de la empresa Rubio Pharma. Para lo cual se utilizaron las siguientes condiciones: 256 líneas de escaneo, 1.0000 Hz de velocidad de escaneo y un área de escaneo de 2 micrómetros. El procesamiento de las imágenes se realizó por medio del software NanoScope Analysis.

VI.2 Obtención de ARN Bicatenario del Gen *vp28*

El protocolo constó en dos partes, primeramente, se amplificó una sección del gen *vp28* del WSSV con la polimerasa Platinum Taq (ThermoFisher). Seguido de lo anterior, se sintetizó el ARNs específico del transcrito del gen antes mencionado, utilizando para este propósito el BLOCK-iT RNAi TOPO Transcription Kit (Thermofisher).

VI.2.1 Amplificación del gen *vp28* de WSSV

Se utilizaron los oligos *vp28Fw*: 5'-AAG-ACC-ATC-GAA-ACC-CAC-ACA-3' y *vp28Rv*: 5'-GTG-CCA-GAG-TAG-GTG-ACG-TG-3', para llevar a cabo la amplificación de un segmento del gen que codifica la proteína VP28 del WSSV, por medio de PCR de punto final, que generan un producto de amplificación de aproximadamente 500 pb. En un vial de 200 μ L se adicionaron 40.3 μ L de agua estéril, 5 μ L de 10x PCR Buffer, 1 μ L de dNTPs (40 mM), 1.5 μ L de $MgCl_2$, 0.5 μ L de cada oligo (10 pM) y 85 ng de ADN *stock* proveniente de camarones infectados con WSSV. El volumen total de reacción fue de 50 μ L. Las condiciones de reacción fueron, 1 ciclo inicial a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 30 s y 72°C por 30 s, por último 1 ciclo de extensión final a 72°C por 7 min. Posteriormente, las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, se tiñó utilizando GelRed (Biotium) y se visualizaron en un fotodocumentador Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad). El protocolo de PCR se repitió en 10 ocasiones y la totalidad de los productos obtenidos se mezclaron en un tubo Eppendorf de 1.5 mL.

VI.2.2 Purificación del amplicón del gen *vp28*

Se purificó el producto de PCR mediante el Illustra GFX PCR DNA Gel and Purification Kit (GE Healthcare), para lo cual se depositaron 100 μ L del producto PCR del gen *vp28* en cinco tubos Eppendorf de 1.5 mL, donde se añadieron 500 μ L de buffer de captura tipo 3 a cada uno, se mezcló y se centrifugó brevemente. Esta mezcla se depositó de manera secuencial en una sola columna GFX MicroSpin, a su vez la columna se colocó en un tubo colector, se centrifugó a 16,000 \times g por 30 s y se descartó el líquido colectado, una vez hecho lo anterior, se repitió el procedimiento hasta que se centrifugó la totalidad de la mezcla de los cinco tubos. Luego, se agregaron 500 μ L de buffer de lavado tipo 1 en la columna, se colocó la misma de vuelta en el

tubo colector, se centrifugó a $16,000 \times g$ por 30 s y se descartó el líquido eluido. Después, se añadieron 20 μL de buffer de elución tipo 6, se colocó la columna en un tubo de 1.5 mL estéril y se dejó incubar por 10 min a temperatura ambiente, seguido de una última centrifugación a $16,000 \times g$ por 1 min, repitiéndose este último paso. Finalmente se determinó la concentración del producto de PCR purificado usando un NanoDrop lite a absorbancias de 260 y 280 nm, se etiquetó y se almacenó a -20°C .

VI.2.3 Ligación

Posterior a la purificación del producto de PCR, se llevó a cabo una reacción de ligación, utilizando para ello 107 ng del amplicón del gen *vp28*, 1 μL de solución salina, 3 μL de agua estéril y 1 μL de BLOCK-iT T7-TOPO Linker (Thermofisher), en un volumen total de reacción de 6 μL . Se incubó a 37°C por 15 min y se colocó en hielo.

VI.2.4 Amplificación secundaria

Se etiquetaron dos tubos Eppendorf de 200 μL de la siguiente manera, sentido positivo y antisentido. En cada uno de ellos se depositaron 5 μL de 10x PCR buffer, 1 μL de dNTPs 40 mM, 1 μL de Block-iT T7 Primer, 40.5 μL de agua estéril, 1 μL de la reacción de ligación y 0.5 μL de la polimerasa Platinum Taq (Thermofisher). Posteriormente, al tubo etiquetado como sentido positivo se le agregó 1 μL del oligo *vp28Fw*, mientras que al tubo antisentido se le agregó 1 del oligo *vp28Rv*. Ambos tubos se mezclaron brevemente por pipeteo y se usó el programa de PCR utilizado para obtener el amplicón de 500 pb del gen *vp28*, para realizar una amplificación secundaria. La concentración de los productos de PCR se cuantificó por medio de un NanoDrop lite a absorbancias de 260 y 280 nm. Se analizaron las muestras por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2%, se tiñeron con GelRed (Biotium) y se visualizaron en un fotodocumentador Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad).

VI.2.5 Transcripción a ARNes

Para transcribir los amplicones generados en la amplificación secundaria, se etiquetaron dos tubos Eppendorf de 0.5 μL libres de RNasas como Trans (+) y Trans (-), así como en el antisentido, se usaron las siguientes condiciones de reacción: 20 μL de agua libre de RNasas, 8 μL de NTPs 75 mM, 4 μL de 10x Transcription Buffer, 6 μL de Block-iT T7 Enzyme Mix. Al

tubo Trans (+) se le agregaron 2 μL del producto de amplificación secundaria del tubo sentido positivo y al tubo Trans (-) 2 μL del tubo antisentido, con un volumen total de 40 μL . Se incubaron a 37°C por 4.5 h. Se añadieron 2 μL de DNasa I (ThermoFisher) y se incubó a 37°C por 15 min. Finalmente, se almacenaron las muestras a -20°C.

VI.2.6 Purificación de ARNs

Con el fin de purificar los transcritos producidos en el paso previo, se realizó el siguiente protocolo: a cada tubo se le agregaron 160 μL de RNA Binding Buffer conteniendo 1% (V/V) β -mercaptoetanol, 100 μL de etanol al 100% y se mezcló por pipeteo, teniendo un volumen final de aproximadamente 300 μL . Se colocaron las muestras, por separado, en una columna RNA Spin Cartridge y se centrifugó a 14,000 \times g por 15 s a temperatura ambiente, descartándose el eluato. Se añadieron 500 μL de 1x Wash Buffer a la columna y se centrifugó a 14,000 \times g por 15 s, se descartó el filtrado y se repitió este paso. Con el propósito de secar la membrana, se centrifugó nuevamente a 14,000 \times g por 1 min. Después, la columna se colocó en un tubo de recuperación y se añadieron a la misma 40 μL de agua libre de RNasas, se incubó a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó a 14,000 \times g por 2 min. Se repitió el paso anterior, obteniéndose un eluato final de aproximadamente 80 μL por muestra. Finalmente, se agregaron 1.6 μL de 50x Annealing Buffer, se mezcló por pipeteo y se determinó la concentración utilizando un NanoDrop lite a absorbancias de 260 y 280 nm.

VI.2.7 Alineación

En un vaso de precipitado de 300 mL se calentó agua hasta el punto de ebullición, una vez ocurrido lo anterior, se retiró el recipiente con agua del horno y se dejó a temperatura ambiente. A la par, se añadieron 3.4 μg de cada uno de los transcritos (Trans (+) y Trans (-)) a un vial Eppendorf de 1.5 mL libre de RNasas, en un volumen total de 137 μL y se colocaron en un flotador. Posteriormente el tubo conteniendo la mezcla de transcritos se colocó en el recipiente con agua y se incubó por 1.5 h, permitiendo que la temperatura del agua disminuyera de manera paulatina, hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se determinó la concentración utilizando un NanoDrop lite a absorbancias de 260 y 280 nm. El resultado de la alineación de los transcritos se etiquetó como ARNs - $\nu\text{p}28$, se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y se contrastó con los transcritos de cadena sencilla, se tiñó utilizando GelRed

(Biotium). Las muestras se visualizaron por medio de un fotodocumentador Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad).

VI.3 Encapsulación de ARNds-*vp28* en las VLPs del PstDV1

Para este fin, se siguió el protocolo propuesto por Combita *et al.* (2001) al cual se le hicieron modificaciones. Se depositaron 500 μ g de VLP del PstDV1 en un vial Eppendorf de 1.5 mL y se añadieron 250 ng de ARNds -*vp28*, a continuación, se agregaron 118 μ L de solución de choque osmótico (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0.01 mM CaCl₂, pH 7.9) y se incubó a 37°C por 10 min, con un volumen total de 241 μ L. La mezcla se diluyó 1:5 con agua Milli-Q y se incubó a 37°C por 20 min. Para determinar la cantidad de ARNds encapsulado, las partículas pseudovirales se trataron con una mezcla de nucleasas (0.2 mg/mL de la endonucleasa DNasa I, libre de RNasas (Amersham Bioscience) y 0.2 mg/mL de la ribonucleasa RNasa A, Concert (Life Technologies), y se incubó a 28°C por 1 h. Posteriormente, se agregó proteinasa K (Qiagen) en una concentración de 1 mg/mL, en presencia de 2% de SDS, y se incubó a 56°C por 2 h. Como control, se utilizó una muestra a la cual no se le aplicó el tratamiento con nucleasas. Para verificar la ausencia de ácidos nucleicos en el interior de las cápsides recombinantes, 500 μ g de VLP del PstDV1 se trataron sólo con 1 mg/mL, en presencia de 2% de SDS, y se incubó a 56°C por 2 h.

Para aislar el ARNds presente en la mezcla de reacción, se realizó una extracción de ARN mediante el reactivo TRIzol (Life Technologies). Las muestras se separaron en alícuotas de 407 μ L, en viales Eppendorf de 2 mL, y se incubaron independientemente en 1 mL de TRIzol por 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se les agregaron 200 μ L de cloroformo. Se agitaron manualmente por 15 s y se incubaron por 15 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 12,000 \times g por 15 min a 4°C, y al concluir la fase acuosa superior se transfirió a un tubo limpio y se le agregó 1 mL de 2-propanol, y se mezcló suavemente, para dejar reposar por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugaron nuevamente a 12,000 \times g por 10 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante por decantación, y a cada muestra se le agregó 1 mL de etanol al 75%. Se centrifugó a 7,500 \times g por 5 min a 4°C, y el alcohol se retiró invirtiendo el tubo. Se dejó secar por 10 min y se les agregaron 30 μ L de agua DEPC. Finalmente. Las muestras se analizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2%, se tiñeron con GelRed (Biotium) y se visualizaron en un fotodocumentador Gel Doc EZ System (Bio Rad).

VII. RESULTADOS

VII.1 Sobreexpresión de la PstDV1-CP

Las proteínas recombinantes se obtuvieron en cuerpos de inclusión, donde se pudo observar la existencia de una banda de aproximadamente 37.5 kDa. La mayor concentración de dicha proteína se obtuvo a las 20 h después de inducir (ddi). En cuanto a la fracción soluble, una vez analizado el gel mediante electroforesis de agarosa en condiciones desnaturalizantes, no se observó la presencia de una proteína que tuviera el peso molecular esperado de la PstDV1-CP (Figura 8).

VII.2 Replegamiento de proteínas en cuerpos de inclusión

A partir de 3 g de biomasa se obtuvo una concentración inicial de proteína de 16.5 mg/mL en 12 mL. Una vez finalizado el protocolo de replegamiento, se obtuvo un rendimiento de 92.69% con respecto a la cantidad total de proteína inicial (Tabla 1). Las bandas más abundantes que se visualizaron corresponden a pesos moleculares de aproximadamente 37.5, 36, 35, 25 y 15 kDa, las cuales se conservan en cada uno de los pasos de replegamiento, disminuyendo progresivamente su concentración relativa (Figura 9).

VII.3 Fraccionamiento proteico con sulfato de amonio

Una vez separadas las proteínas en solución, se obtuvieron 4 fracciones (Figura 10). En la porción correspondiente a las proteínas que precipitaron con una concentración de 20% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, no se visualizaron bandas. En la fracción de 40% se observaron distintas proteínas con un amplio rango de pesos moleculares, entre las cuales existen bandas de aproximadamente 37.5, 36, 35 y 25 kDa. En la fracción de 60% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se apreció un patrón de bandeo difuso y sin bandas definidas. Mientras que en el sobrenadante se pudo observar una gran cantidad de proteínas con diversos pesos moleculares.

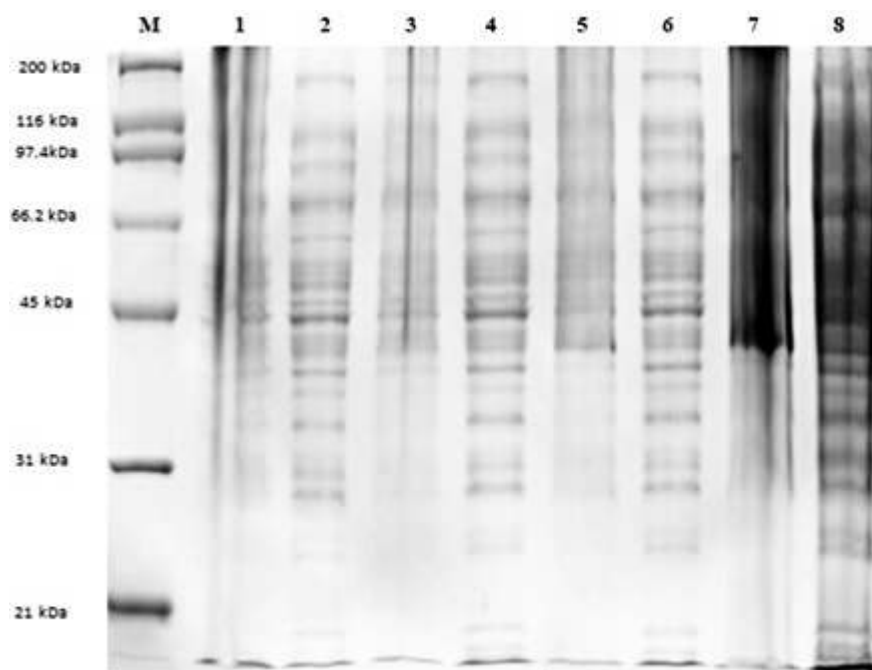


Figura 8. Sobreexpresión de PstDV1. Carril M, marcador de peso molecular; carril 1, precipitado 0 h ddi; carril 2, sobrenadante 0 h ddi; carril 3, precipitado 4 h ddi; carril 4, sobrenadante 4 h ddi; carril 5, precipitado 6 h ddi; carril 6, sobrenadante 6 h ddi; carril 7, precipitado 20 h ddi; carril 8, sobrenadante 20 h ddi.

Tabla 1. Rendimiento del replegamiento de proteínas en cuerpos de inclusión. A partir de un total de 198 mg de proteína que se encontraban desnaturalizadas en cuerpos de inclusión, se obtuvo un total de 183.54 mg una vez se finalizó el protocolo de replegamiento.

	Inicio de replegamiento	Final de replegamiento
Concentración proteica	16.5 mg/mL	3.8237 mg/mL
Volumen de muestra	12 mL	48 mL
Concentración Urea	8M	0.5M
Total de proteína	198 mg	183.54mg
Rendimiento (%)	92.69%	

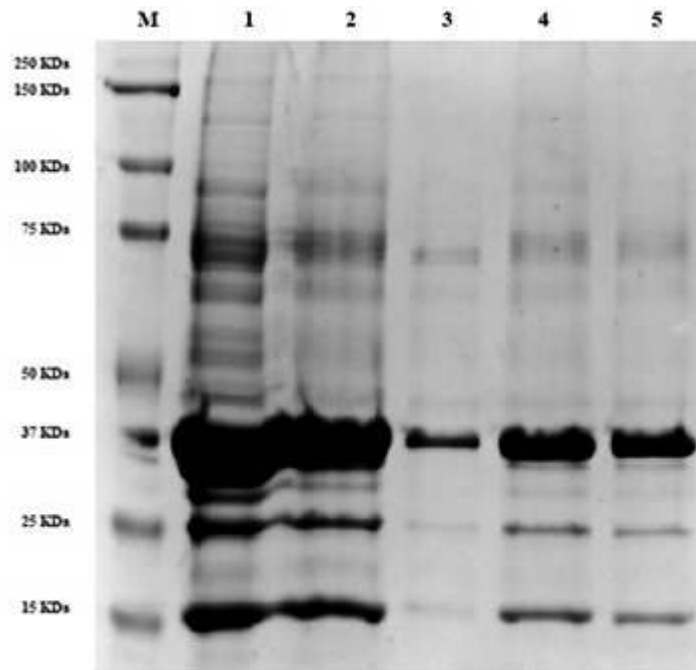


Figura 9. SDS PAGE del replegamiento de proteínas en cuerpos de inclusión. Carril M, marcador de peso molecular; carril 2, proteína en 8M urea; carril 3, proteína en 4M urea; carril 4, proteína en 2M urea; carril 5, proteína en 1M urea; carril 6, proteína en 0.5 M urea.

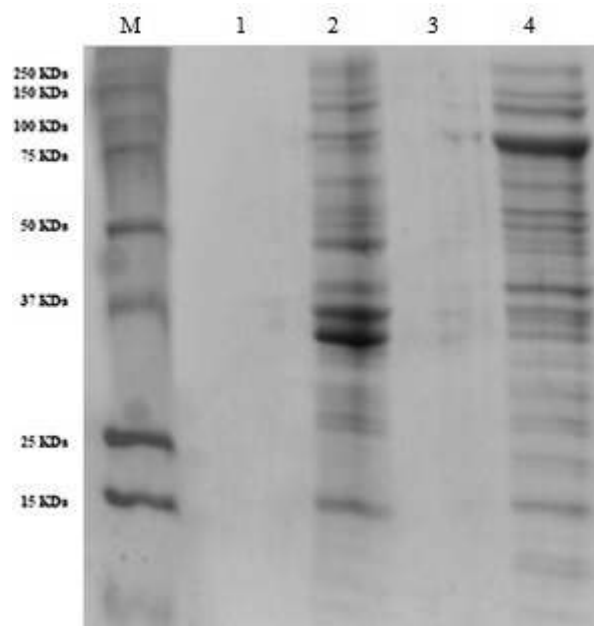


Figura 10. Fraccionamiento con sulfato de amonio. Carril M, marcador de peso molecular; carril 2, fracción 20% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; carril 3, fracción 40% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; carril 4, fracción 60% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; carril 5, sobrenadante.

VII.4 Identificación de proteínas recombinantes

Como resultado de la realización de la técnica Western-blot, se obtuvieron 4 señales, correspondientes a proteínas cuyos pesos moleculares son de alrededor de 37.5, 36, 35 y 25 kDa (Figura 11).

VII.5 Cromatografía de la Cápside del *Penstyldensovirus* de Decápodos 1

En la Figura 12 se aprecian cuatro picos de absorbancia definidos en el cromatograma obtenido. El primer pico, de aproximadamente 1250 mAU, corresponde a las fracciones 13-17, posterior a los 100 mL de elución. Los picos de absorbancia restantes tienen intensidades de alrededor de 200 mAU, las fracciones de elución correspondientes son 25-27, 33-37 y 44-48, respectivamente. Debido a lo anterior, las fracciones que conformaron cada pico se mezclaron en una sola, en ese mismo orden. Posteriormente, las muestras se analizaron por medio de SDS-PAGE, y se obtuvo el patrón de bandeo mostrado en la Figura 13, en la que se observa que en el carril correspondiente a las fracciones 13-17 existen seis bandas con pesos aproximados de 70, 65, 37.5, 36, 35 y 25 kDa. Estas mismas bandas son observables en el carril 2 (fracciones 33-37) en conjunto con distintas proteínas de pesos moleculares variados. Por otra parte, en el carril 5 se distinguen diferentes bandas con una alta intensidad. Posterior a la concentración de la muestra correspondiente al pico 1, por medio de Amicon de 100 kDa se observaron distintas bandas, además de las visualizadas previamente, con pesos moleculares diversos (Figura 14).

VII.6 Ultracentrifugación con Gradiente de Sacarosa

A excepción del carril 1, en todos los carriles se pueden observar la misma cantidad de bandas, las cuales cuentan con pesos moleculares iguales (Figura 15). No obstante, en el carril 1, correspondiente a la fracción de 70% de sacarosa, se visualizaron sólo 4 bandas, con pesos aproximados de 37.5, 36, 35 y 25 kDa, respectivamente. Como se mencionó, estas bandas también están presentes en el resto de los carriles, sin embargo, su concentración es distinta.

VII.7 Identificación de proteínas por Espectroscopía de Masas

Como resultado de la identificación de proteínas, se obtuvo que con base en el espectro generado por la muestra secuenciada (25 kDa), se tiene una probabilidad superior al 95% de que se trate de la PstDV1-CP (UniProt: A0A0A1FZ23_IHHNV)

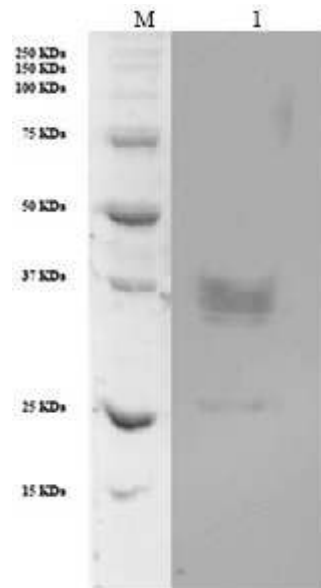


Figura 11. Western-blot. Carril M, marcador de peso molecular; carril 2 muestra.

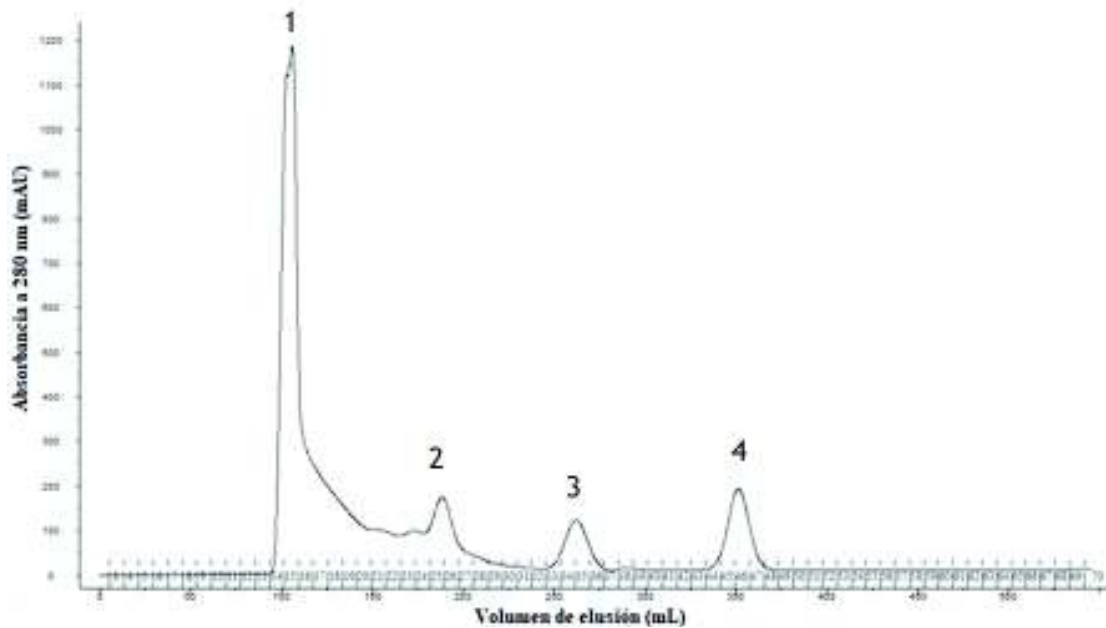


Figura 12. SEC de la cápside del *Penstyldensovirus* de decápodos 1. Cromatografía de exclusión de peso molecular a partir de las proteínas fracción 40% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

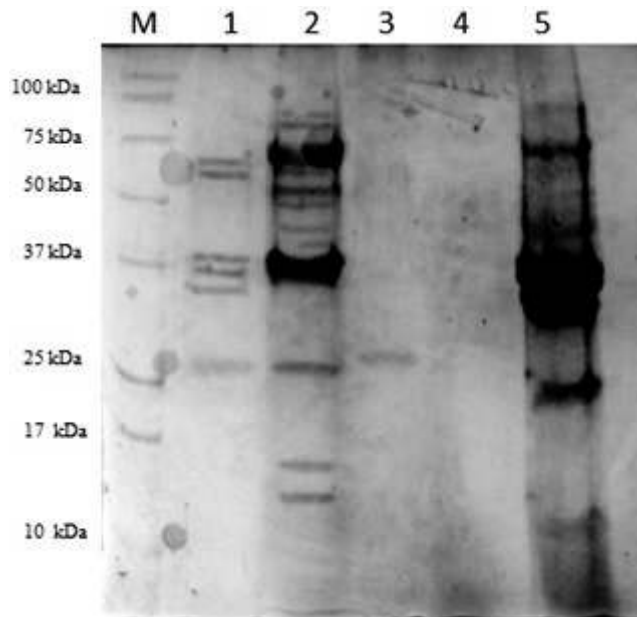


Figura 13. Fracciones de elusión obtenidas mediante cromatografía de exclusión de peso molecular. Carril M Marcador de peso molecular; carril 1 fracciones 13-17; carril 2 fracciones 25-27; carril 3, fracciones 33-37; carril 4, fracciones 44-48; carril 5, cuerpos de inclusión 8M urea.

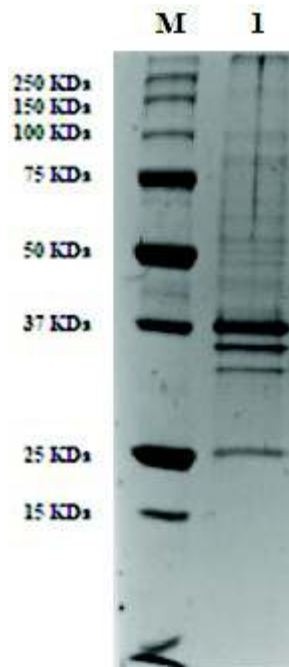


Figura 14. SDS-PAGE de las fracciones 13-17 una vez concentradas. Carril M, marcador de peso molecular; carril 1, muestra concentrada.

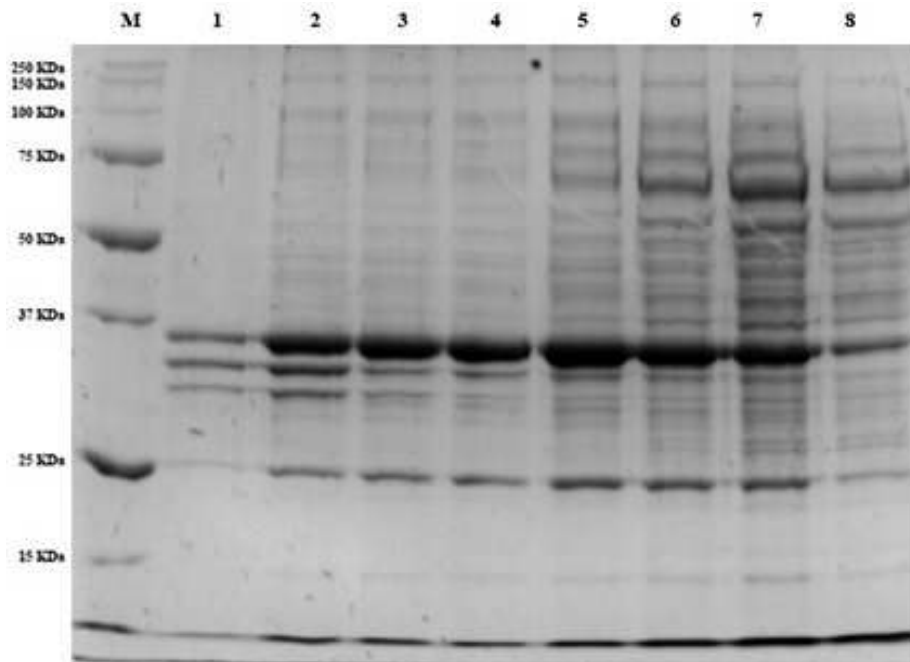


Figura 15. SDS-PAGE de fraccionamiento proteico por gradiente de sacarosa. Las proteínas presentes en cada una de las fracciones del gradiente se analizaron mediante SDS-PAGE, encontrándose distintas similitudes entre estas. Carril M, marcador de peso molecular; carriles 1-7 fracciones 70-10% de sacarosa, en orden descendente.

VII.8 Visualización de las Partículas Virales y Pseudovirales Mediante TEM

Mediante el análisis de la muestra, por medio de microscopía electrónica de transmisión, así como el inóculo viral, se observaron partículas icosaédricas de alrededor de 20-25 nm (Figura 16), tanto en la muestra de la cápside recombinante, como en el inóculo viral. Por otra parte, el inóculo viral presentó un mayor número de copias virales por campo.

VII.8 Visualización de Pseudopartículas Virales Mediante AFM

Al escanear la muestra utilizando microscopía de fuerza atómica, se encontraron partículas de alrededor de 22 nm de diámetro (Figura 17) con morfología similar a las observadas para PstDV1.

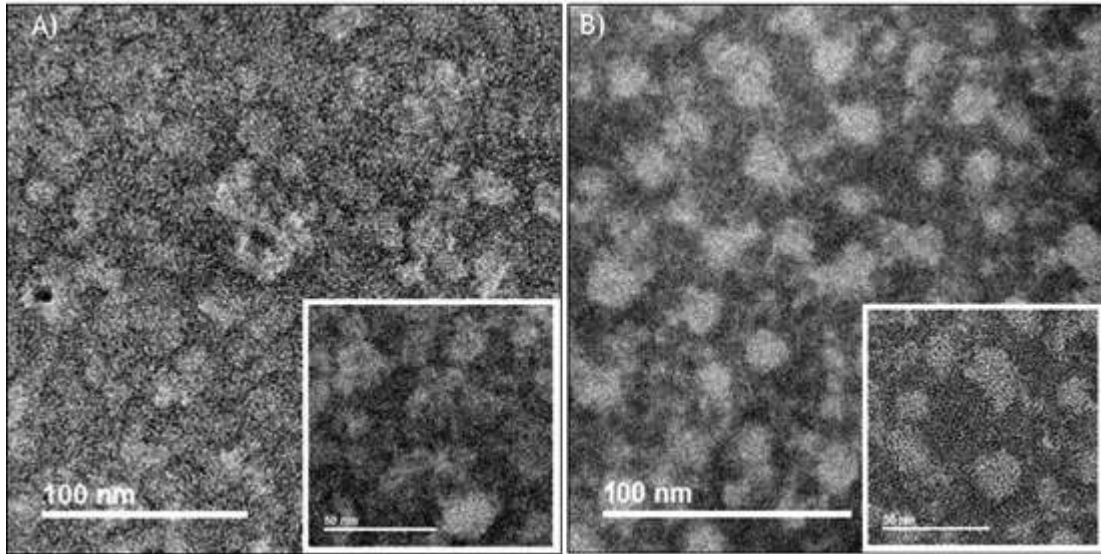


Figura 16. Microscopía electrónica de transmisión de A) partículas pseudovirales y B) partículas en el inóculo viral. En ambos casos las partículas median alrededor de 22 nm.

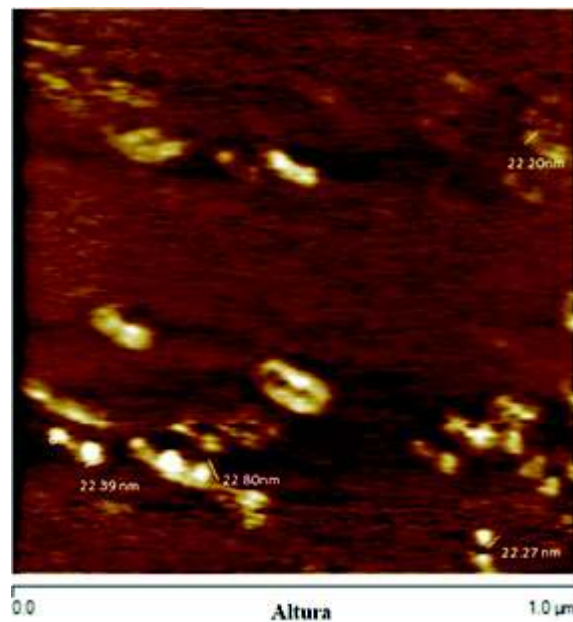


Figura 17. Microscopía de fuerza atómica. Las partículas pseudovirales contenidas en la muestra, presentaron un diámetro aproximado de 22 nm, una vez que se visualizaron utilizando una celda de 200 nm.

VII.9 Síntesis de ARNs

Como resultado de la amplificación por medio de PCR de la región de interés del gen *vp28* del WSSV y el posterior análisis del producto de PCR por medio de electroforesis en gel de agarosa, se observó la existencia de una sola banda, con una extensión de aproximadamente 500 pb (Figura 18).

Una vez que se purificó el amplicón del gen *vp28*, se ligó con BLOCK-iT T7-TOPO Linker. Posteriormente se llevaron a cabo dos PCR en tubos separados, en donde se incluyó el oligo forward o reverse, para después reamplificar y visualizar los productos por electroforesis en gel de agarosa. En ambos casos se obtuvo una sola banda de alrededor de 500 pb (Figura 19).

Finalmente, después de llevar a cabo la alineación de los transcritos en sentido positivo y negativo, mediante tratamiento térmico, se analizó el producto mediante electroforesis en gel de agarosa, en este caso se pudieron visualizar distintas bandas, con extensiones aproximadas de 500, 550, 800 y 1000 pb. De las cuales, la de mayor intensidad fue la de 550 pb, seguido por la 500 pb y finalmente las de 800 y 1000 pb con intensidades similares (Figura 20).

VII.10 Encapsulación de ARNs-*vp28* en las VLPs del PstDV1

Para determinar la concentración necesaria de nucleasas necesaria para digerir 500 ng de ARNs-*vp28*, se trató ARNs bicatenario desnudo con dos concentraciones de nucleasas y se determinó que para digerir completamente el ARNs son necesarios 0.2 mg mL^{-1} de cada una de las nucleasas. Por otra parte, al aplicar el tratamiento para disrumpir la estructura de la VLP y llevar a cabo la digestión de las proteínas que la conforman, se extrajo ARN y se analizó por electroforesis en gel de agarosa, en búsqueda de ARN bacteriano que pudiera haber quedado encapsulado en la VLP, no obstante, no se visualizó ninguna banda en el carril correspondiente a este tratamiento (Figura 21).

Después de realizar los extractos de ARN total de las VLPs cargadas con ARNs-*vp28* y evaluar los mismos mediante electroforesis en gel de agarosa, en todos los casos se pudieron visualizar bandas de aproximadamente 550 pb de distintas intensidades. Se determinó la cantidad de ARNs presente por medio de densitometría, obteniendo en el carril correspondiente a las VLPs sometidas a tratamiento de nucleasas un total de 75 ng. Por otra

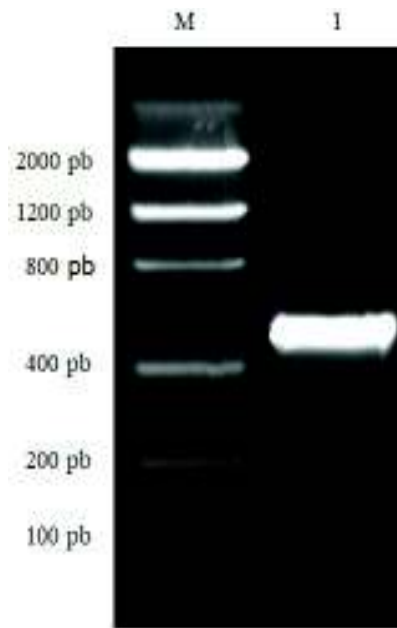


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del gen *vp28*. Carril M, marcador de peso molecular; Carril 1, amplicón *vp28*

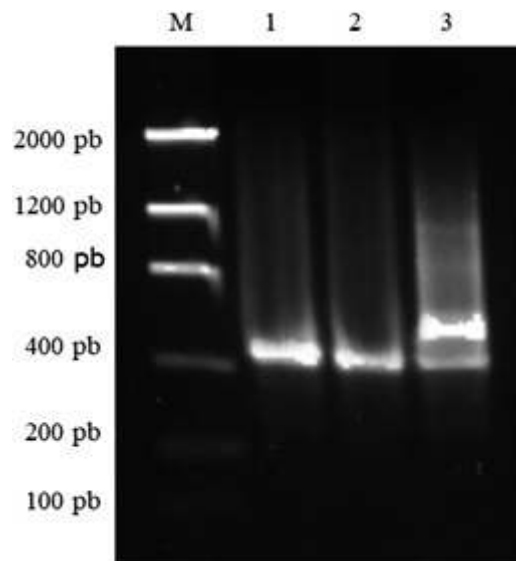


Figura 19. Electroforesis de los transcritos de sentido positivo y antisentido, en contraste con ARNds-*vp28*. Carril M, marcador de peso molecular; Carril 1, transcrito de sentido positivo; Carril 2, transcrito antisentido; Carril 3, ARNds-*vp28*

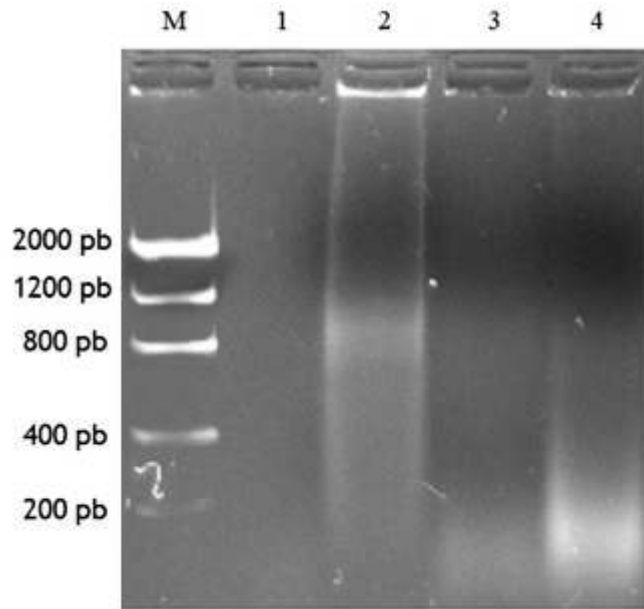


Figura 20. Controles de digestión de ARNs y ausencia de ARN en la VLP. Carril M, marcador de peso molecular; Carril 1, vacío; Carril 2, ARNs-*vp28* tratado con 0.1 mg/ml de RNase A, Concert (Life Technologies); Carril 3, ARNs-*vp28* tratado con 0.2 mg/ml de RNase A, Concert; Carril 4, cápside vacía.

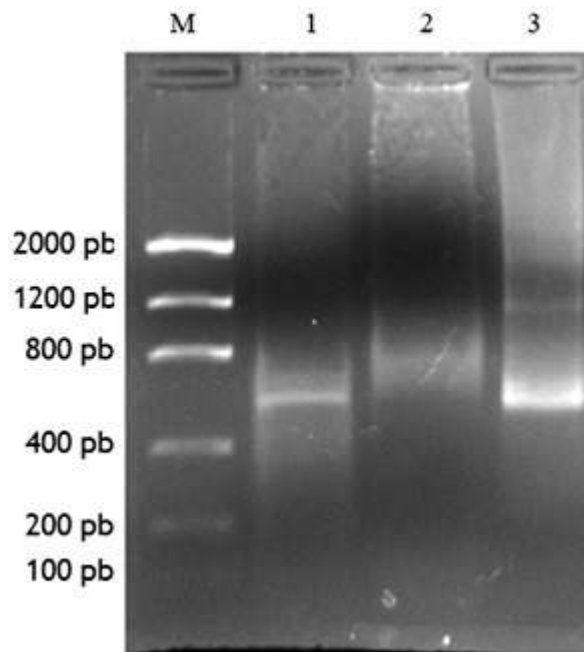


Figura 21. Electroforesis de la encapsulación de ARNs-*vp28* en las VLPs derivadas del PstDV1. Carril M, marcador de peso molecular; Carril 1. VLPs cargadas con ARNs-*vp28* sin tratamiento de nucleasas; Carril 2, VLPs cargadas con ARNs-*vp28* sometidas al tratamiento con nucleasas; Carril 3, 500 ng de ARNs-*vp28* como control.

parte, en el control de VLPs cargadas con ARNds- $\nu p28$ a las que no se les aplicó el tratamiento antes mencionado, se pudo observar que la banda de 550 pb tiene una intensidad mayor, conteniendo aproximadamente 213 ng de ARN bicatenario.

VIII. DISCUSIÓN

VIII.1 Purificación de la cápside del *Penstylidensovirus* de decápodos 1

Parte del protocolo de purificación de la VLP del PstDV1 se realizó mediante la técnica cromatográfica SEC, donde la matriz utilizada como fase estacionaria cuenta con poros de distintos tamaños, no obstante, cuentan con un tamaño máximo, de tal forma que una proteína de mayor radio molecular que el poro no entrará a los mismos, y se desplazará a través de la columna en conjunto con la fase móvil, creando un desfase entre los péptidos de menor tamaño y el resto. De tal forma, las proteínas de mayor tamaño son retenidas por menos tiempo en la resina que su contraparte (Bonner, 2007). En el cromatograma obtenido, se pudieron apreciar cuatro picos de absorbancia bien definidos, el primero de estos se identifica posterior a los 100 mL de elución. Por lo tanto, de acuerdo al fundamento del método SEC antes descrito, el primer pico corresponde a las partículas de más alto peso molecular, por lo que, tomando en cuenta el peso de la cápside recombinante (~2300 kDa), podría suponerse que dicha señal corresponde a la cápside misma, en conjunto con proteínas que superaran el tamaño máximo de poro de la resina de la columna HiPrep S-300 HR (>1500 kDa).

Las fracciones de elución recolectadas se analizaron por medio de SDS-PAGE, donde se determinó la existencia de cuatro bandas en el carril correspondiente a las fracciones 13-17. Al concentrar el volumen total de elución hasta un volumen final de 7.5 mL y volver a analizar la muestra mediante SDS-PAGE, se corroboró que las bandas con pesos aproximados de 37.5, 36, 35 y 25 kDa siguen presentes en el dializado final. No obstante, también se observó la presencia de diferentes proteínas en menores concentraciones. Por lo anterior, la muestra concentrada se fraccionó mediante ultracentrifugación por gradiente de sacarosa, que separa las proteínas de acuerdo a su densidad relativa. En las diferentes fracciones se visualizaron, una gran cantidad de proteínas que, aparentemente, tienen el mismo peso molecular. Entre estas, las cuatro proteínas mencionadas anteriormente. Sin embargo, en la fracción de 70% de sacarosa solamente se observaron estas cuatro proteínas. Al realizar la metodología de Western-blot, para detectar proteínas con etiquetas His-tag, se corroboró que las bandas de 37.5, 36, 35 y 25 kDa

son inmuno-detectadas por el anticuerpo anti-histidinas. De dichas proteínas, la de 37.5 kDa, tiene un peso que corresponde al peso reportado de la PstDV1-CP (Bonami *et al.*, 1990; Hou *et al.*, 2009; Kaufmann *et al.*, 2010b; Dhar *et al.*, 2014). No obstante, existe una pérdida considerable de las proteínas antes mencionadas, ya que se distribuyen en las fracciones del gradiente. Como resultado de la identificación de proteínas, se obtuvo que la proteína de 25 kDa genera un espectro que cubre el 8.5% de la PstDV1-CP y una probabilidad mayor a 95% de que la proteína contenida en la muestra sea la proteína de la cápside del PstDV1.

El hecho de que las bandas asociadas a las proteínas de 37.5, 36, 35 y 25 kDa se hayan observado en todas las fracciones del gradiente de sacarosa, podría deberse a la existencia de unidades de la PstDV1-CP que se encontraran formando capsómeros u oligocapsómeros independientes (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012), no obstante, la muestra sometida a ultracentrifugación fue primeramente purificada mediante SEC. Como se mencionó anteriormente, la columna HiPrep S-300 HR tiene un tamaño de poro máximo de 1500 kDa, por lo que todas aquellas proteínas o arreglos multiméricos de radio menor a dicho valor, se encontrarían ausentes en la muestra misma. Además, producto de la visualización de las VLPs del PstDV1 por TEM y AFM, no se observaron partículas de tamaño menor al esperado (22 nm). Otro factores que pudieran afectar a la distribución de las moléculas en un gradiente es el tiempo de centrifugación, así como la distribución de las partículas en el medio líquido (Majekodunmi, 2015). Sánchez-Rodríguez *et al.* (2012), obtuvieron resultados similares al purificar la VLP del parvovirus B19 mediante ultracentrifugación con gradiente discontinuo de CsCl. Una vez aislada la VLP, determinaron que el 25% de las VLPs totales se encontraba distribuida a lo largo del gradiente. Un punto importante a señalar es que tanto los autores antes mencionado, como en la presente investigación, las VLPs no se concentraron de manera previa a realizar el fraccionamiento por medio de gradiente. Distintos métodos han sido descritos para concentrar las partículas, disminuyendo así la dispersión de las mismas en el medio, entre estos se encuentran la precipitación de las VLPs por medio de ultracentrifugación, formando un *pellet* en el fondo del tubo, o bien utilizando la metodología conocida como ultracentrifugación en gradiente de cojín (Gias *et al.*, 2008; Negrete *et al.*, 2014; Strobel *et al.*, 2015; Merten y Gaillet, 2016). Sin embargo, la precipitación directa promueve el desensamble de las VLPs (Møller-Larsen y Christensen, 1998), por ende, es probable que mediante la ultracentrifugación en

gradiente de cojín se pudiera mejorar el rendimiento final del protocolo de purificación, aumentando así la eficiencia y rendimiento del mismo.

Como se mencionó anteriormente, en la actualidad se acepta el hecho de que la cápside del PstDV1 está compuesta por 60 monómeros de una sola proteína (Hou *et al.*, 2009; Kaufmann *et al.*, 2010a). Lo anterior, debido a que Shike *et al.* (2000) aislaron partículas virales silvestres del PstDV1 mediante un gradiente de CsCl, amplificaron el genoma viral mediante PCR, y posteriormente lo secuenciaron. Así, mediante el análisis bioinformático de dicha secuencia, concluyeron que el genoma de este patógeno contiene tres ORFs, de los cuales el ORF derecho codifica para una proteína de la cápside, no encontrando evidencia de la existencia de otro gen codificante de otras proteínas estructurales. No obstante, Bonami *et al.* (1990) tras aislar y caracterizar partículas virales del patógeno antes mencionado, y mediante la disociación de los viriones, y el posterior análisis de las proteínas estructurales de los mismos por medio de SDS-PAGE, determinaron la existencia de cuatro proteínas adicionales (74, 47, 39 y 37.5 kDa).

Por otra parte, Hou *et al.* (2009) reportaron que al hacer uso del sistema de expresión de *E. coli* para sobreexpresar la PstDV1-CP, una vez que purificaron las partículas pseudovirales, observaron la presencia de cinco bandas (~70, 67, 39, 37 y 35 kDa), de las cuales las de 70 y 39 kDa contaban con His-tag. De manera similar, Kaufmann *et al.* (2010) al sobreexpresar la PstDV1-CP en células de insectos, mediante el sistema baculovirus, observaron que al aislar las partículas pseudovirales y analizar la composición proteica se apreciaban dos bandas (~37 y 36 kDa), sin embargo, asociaron la de menor peso molecular a una posible degradación por proteasas de la primera. Además, los resultados encontrados en estas investigaciones podrían relacionarse con lo reportado por Dhar *et al.* (2010) quienes, a partir de ARN total aislado de camarones de la especie *P. vannamei*, analizaron los transcritos de PstDV1 mediante el uso de una sonda específica para dicho virus y la técnica de Northern Blot, encontrando cinco bandas (4.1, 2.6, 1.9, 1.3 y 0.9 kb), las cuales relacionaron con la transcripción del genoma viral completo, ORF izquierdo (NS1), ORF medio (NS2), ORF derecho (PstDV1-CP) y un ORF putativo que se encuentra codificado en el genoma en sentido negativo. En ese mismo orden, a partir del ORF izquierdo, los ARNm codifican péptidos de 666, 363 y 329 aa, mientras que el producto del ORF de menor tamaño no ha sido evaluado. Por lo anteriormente expuesto, se concluyó que las proteínas 37.5, 36, 35 y 25 kDa, pudieran formar parte de las partículas pseudovirales. Con relación a lo anterior, las proteínas encontradas por los autores antes

mencionados son de pesos muy similares a las encontradas en este estudio, pudiendo existir ligeras diferencias en la estimación del peso molecular. No obstante, en ninguno de los estudios antes mencionado se determinó la secuencia de aminoácidos de los péptidos encontrados. Por otra parte, en esta investigación se logró identificar la proteína de 25 kDa como la PstDV1, no obstante, solamente el espectro de la proteína fue utilizado para llevar a cabo dicha comparación, y no la secuencia misma, por lo que esta banda pudiera corresponder a un producto de degradación proteolítica, o bien a factores desconocidos a la fecha. Sin duda alguna, se requieren más estudios al respecto, siendo el PstDV1 uno de los virus que más alto impacto tiene en la industria camaronícola, es relativamente poco lo que se conoce respecto a este patógeno. Dicha investigación, podría generar conocimiento que conllevara al desarrollo de métodos de control, o bien, que ayude a entender de una mejor manera los mecanismos moleculares que intervienen en el proceso infeccioso. Por ejemplo, evaluar la existencia de estructuras secundarias en el ARNm del gen que codifica para la PstDV1-CP, lo cual, de encontrarse alguno, podría explicar de manera plausible la obtención de proteínas de distintos pesos moleculares, relacionadas tanto a la cápside de los virus nativos, como al producto de la sobreexpresión de la proteína de cápside conocida.

VIII.2 Visualización de Partículas Pseudovirales por Microscopía

Como resultado de la visualización de las dos muestras utilizando TEM, se pudieron observar partículas de aproximadamente 22 nm, tanto en el inóculo viral como en la muestra de partículas pseudovirales del PstDV1. Dichas partículas estaban delimitadas por cinco y seis lados, propio de la observación de viriones con estructura icosaédrica (Bonami *et al.*, 1990). De manera similar, al escanear la muestra mediante AFM, se encontró la presencia de partículas de alrededor de 22 nm, así como cúmulos de estas partículas. Lo anterior es consistente con lo reportado con anterioridad por distintos autores (Bonami *et al.*, 1990; Hou *et al.*, 2009; Kaufmann *et al.*, 2010). Por otra parte, se pudo apreciar que las partículas de virus nativos presentan una coloración mucho más clara, mientras que las partículas virales se observan de un color oscuro. De acuerdo a Bonami *et al.* (1990) esto último es debido a que los viriones son más densos, al contar en su interior con el genoma viral, contrario a las VLPs que se encuentran vacías. Por otra parte, se apreció una concentración mucho mayor de viriones en el inóculo, lo cual podría estar relacionado con la baja concentración de proteína con la que contaba

la muestra utilizada para la visualización de las cápsidas recombinantes, además de que este método se llevó a cabo a partir de una muestra no purificada y con condiciones de repliegamiento distintas a las que se determinaron una vez que se optimizó el método.

VIII.3 Síntesis de ARNds-*vp28*

Para que ocurra el silenciamiento de la expresión génica mediado por ARNi, se requiere de ARNds que exceda la longitud promedio de los ARNic. No obstante, para que la eficiencia del silenciamiento sea óptima es necesario que el ARNds tenga una longitud en el rango de 500 – 1000 pb (Tuschl *et al.*, 1999). Por tal motivo, se diseñaron oligos que generaran un amplicón de tamaño adecuado (500 pb). Así mismo, la secuencia fue seleccionada tomando en cuenta que esta no tuviera homología con genes de *P. vannamei*.

Producto de la síntesis de los transcritos en sentido positivo y antisentido, se obtuvo en ambos casos, la presencia de una sola banda de alrededor de 500 pb, consistentes con el tamaño del producto de PCR generado a partir del gen *vp28*, con lo cual, al no existir productos inespecíficos, se pudo confirmar la especificidad de los oligos diseñados. Una vez analizado el resultado de la alineación por medio de electroforesis, se pudo observar la existencia de cuatro bandas de distinta intensidad en el carril correspondiente a la muestra. Los pesos de dichas bandas fueron de aproximadamente 500, 550, 800 y 1000 pb. De las anteriores, las bandas de 500 y 550 pb corresponden a los transcritos de cadena sencilla y al ARNds-*vp28*. Cabe señalar que, a pesar de que aún se puede apreciar la presencia de transcritos no apareados en la reacción final, éstos se encuentran en una concentración menor, lo que podría indicar que no se obtuvo un 100% de rendimiento en cuanto a la síntesis de ARNds se refiere.

Las moléculas de ARNds son propensas a formar estructuras secundarias, lo que a su vez puede afectar su difusión y movimiento a través de una matriz cuando se analiza estos ácidos nucleicos por medio de electroforesis, moviéndose más lento que otros complejos menos voluminosos o de conformación lineal (Bhattacharyya *et al.*, 1990; Lodhi *et al.*, 2010). De esta manera, si se analizan mediante electroforesis con distintas moléculas de ARN bicatenario que tengan la misma extensión, pero que cuentan con estructuras secundarias con distintos niveles de complejidad, aquellas que posean una estructura más sencilla difundirán de manera más rápida a través del campo electromagnético. Lo anterior pudiera explicar de manera plausible la aparente diferencia de longitud entre los transcritos (en sentido positivo y antisentido) y el

ARNds-*vp28*. Así mismo, tomando en cuenta lo anteriormente expuesto, además del hecho de que en los patrones electroforéticos de los transcritos generados del gen *vp28*, utilizados como materia prima para la síntesis de ARNds-*vp28*, no se observaron bandas de distinto peso molecular al esperado, es muy probable que los fragmentos que tienen un peso aparente de 800 y 1000 pb pudieran deberse a la existencia de estructuras secundarias del ARNds-*vp28*, o bien, a lo que se denomina como alineación ramificada de transcritos (Simiano-Tavares *et al.*, 2012).

VIII.4 Encapsulación de ARNds-*vp28* en VLPs del PstDV1

Como se mencionó anteriormente, la producción de partículas pseudovirales mediante la expresión de proteínas estructurales en sistemas heterólogos, seguido del autoensamblamiento de las cápsides recombinantes, conlleva consigo el riesgo acarrear en el interior de las VLPs moléculas inherentes al microorganismo utilizado como sistema de expresión. Por ende, uno de los métodos más utilizados para encapsular biomoléculas dentro de VLPs es el desensamblamiento de las mismas, eliminación de contaminantes procedentes del sistema de expresión y el reensamblamiento de las partículas en presencia de la biomolécula de interés, sin embargo, esta serie de pasos no es necesaria cuando las VLPs son plegadas *in-vitro* (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012).

La utilización de la metodología de choque osmótico para cargar VLPs con ácidos nucleicos y otras moléculas pequeñas, se basa en la estructura de las partículas mismas. Como se mencionó de manera previa, las cápsides del PstDV1 nativo y las pseudopartículas virales están conformadas por capsómeros que interaccionan entre sí para conformar una estructura icosaédrica. Dichas partículas, a pesar de ser sumamente compactas, cuentan en su topografía con estructuras denominadas canales de simetría quintuple, que son la única vía desde el exterior al interior de la cápside (Cotmore y Tattersall, 2007). Una vez que se sometieron las VLPs del PstDV1, en presencia del ARNds-*vp28*, a condiciones de choque osmótico, se procedió a tratar la muestra con una combinación de nucleasas, con el fin de digerir todas aquellas moléculas de ARN bicatenario que se encontraran por fuera de la cápside recombinante. Por otra parte, como control se utilizaron VLPs cargadas a las que no se les aplicó el tratamiento de nucleasas.

Con el fin de verificar la capacidad de encapsulación de ARNds de las VLP del PstDV1, así como indagar sobre la protección contra la acción de nucleasas, se digirieron las partículas pseudovirales y se extrajo ARN. Por medio de electroforesis en gel de agarosa, se observó una

banda de alrededor de 550 pb consistente con el peso del ARNds-*vp28*. La intensidad de la banda observada es menor en comparación con la banda observada en el tratamiento control. Para estimar la cantidad de ARNds contenido en dichas bandas, se contrastaron contra la intensidad de una banda generada por 500 ng de ARNds-*vp28* desnudo. De esta forma, se determinó la banda observada en el tratamiento control está formada por aproximadamente 213 ng, mientras que en la muestra se estimaron aproximadamente 75 ng.

Como se mencionó anteriormente las moléculas encapsuladas en el interior de las partículas pseudovirales se encuentran protegidas contra condiciones adversas, tales como la acción enzimática (Kolliopoulou *et al.*, 2017). Lo cual sugiere que, en este caso, 138 ng de ARNds-*vp28* que no se encapsuló dentro de las cápsides recombinantes, quedó expuesto a la acción de las nucleasas, siendo digerido en su totalidad. Estos resultados, aunado a la visualización de las VLPs por medio de TEM y AFM, indican que la PstDV1-CP se plegó de manera mimética a la proteína de la cápside del PstDV1 nativo, ya que se conserva la estructura icosaédrica de la cápside, además de conservar estructuras altamente complejas como lo son los canales del eje de simetría quintuples. Tomando en cuenta lo anterior, los resultados obtenidos indican que 500 µg de las VLPs del PstDV1 tienen capacidad de encapsular aproximadamente 75 ng de ARNds-*vp28*, y que a su vez pueden fungir como protección del mismo contra la degradación enzimática. No obstante, cabe señalar que, por lo general se considera que las ARNasas de tipo A y las ARNasas de tipo III digieren específicamente ARN de cadena sencilla y ARNds, respectivamente (Yodmuang *et al.*, 2006; Attasart *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2011), sin embargo, es sabido que para que las ARNasas A presenten dicha selectividad, es necesario llevar a cabo la reacción de digestión enzimática en condiciones de concentración de sal superiores a las utilizadas en la presente investigación (>0.3M) (Edy *et al.*, 1976; Ma *et al.*, 1996; Sorrentino *et al.*, 2003; Kawashima y Tsuji, 2018). Resultados similares fueron obtenidos por Sánchez-Rodríguez *et al.* (2015) quienes lograron encapsular hasta 150 ng de ADNdh por cada mg de VLPs del parvovirus humano B19, mediante la técnica de reensamblamiento de la cápside recombinante. Considerando la alta similitud física de los viriones de los parvovirus, se puede adjudicar a la gran capacidad de las VLPs del PstDV1 para encapsular ARN reportado por Hou *et al.* (2009) la cual supera por mucho al encapsulamiento de ADNds. No obstante, Sinnuengnong *et al.* (2018) encapsularon ARNds en VLPs del PstDV1 mediante el autoensamblamiento de las mismas dentro del sistema de expresión *E. coli*, en el cual, además

co-expresaron ARN bicatenario. Dichos investigadores reportaron que estas partículas podían encapsular 20 ng de ARNs por cada 2 mg de VLPs del PstDV1. Como se mencionó anteriormente, este tipo de metodología puede provocar la digestión parcial del ARNs por ARNasas III inherentes al sistema de expresión, lo que pudo haber provocado que se perdiera parte del ARN bicatenario a encapsular, o bien, pudiera significar que el método de ósmosis inversa es más eficiente para este fin, logrando encapsular una cantidad 15 veces mayor a lo reportado por Sinnuengnong *et al.* (2018). No obstante, la utilización de metodologías más sensibles para la cuantificación del ARN bicatenario encapsulado, como RT-qPCR, podría ayudar a corroborar los datos obtenidos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que las VLPs del PstDV1 ensambladas *in vitro* pudieran ser consideradas como un potencial vehículo de entrega de ARNs-*vp28* a las células diana, siendo capaces de encapsular el ARN bicatenario y protegerlo de la acción de nucleasas que, de otro modo, podrían digerirlo de manera parcial o en su totalidad, lo cual se ha asociado a la baja eficiencia de distintas metodologías de administración de ARNs (Kolliopoulou *et al.*, 2017; Peng *et al.*, 2018). Anteriormente se reportó que las VLPs, al igual que los viriones nativos, pueden ingresar a las células diana y entregar biomoléculas de interés (Hou *et al.*, 2009; Kiatmetha *et al.*, 2018). Generalmente, en los parvovirus, el proceso infeccioso consta de 4 estadios: 1) unión a receptores de la superficie celular, 2) internalización vía endocitosis, 3) escape de las vesículas endocíticas, y 4) entrega nuclear del material genético mediante el desensamble completo de la cápside (Johnson y Dudleenamjil, 2012; Vega-Heredia *et al.*, 2012). Lo anterior, pudiera resultar beneficioso para el silenciamiento del gen *vp28* del WSSV, ya que recientemente se ha reportado la actividad del mecanismo de ARNi en el núcleo de distintas especies, que interactúa directamente con el sistema encontrado en el citoplasma (Castel y Martienssen, 2013; Gagnon *et al.*, 2014; Kalantari *et al.*, 2016b), y se ha asociado a la heredabilidad del silenciamiento de la expresión génica en al menos un invertebrado (Burton *et al.*, 2011).

En comparación con los métodos reportados previamente para la encapsulación de ácidos nucleicos en las VLPs del PstDV1, la metodología utilizada en la presente investigación presenta la ventaja de, al no contener ácidos nucleicos contaminantes inherentes al sistema de expresión, evitar pasos posteriores para eliminar contaminantes, así como reducción en los costos y el tiempo que pudiera implicar la realización de los mismos (Sánchez-Rodríguez *et al.*,

2012). Aunado a lo anterior, la efectividad de la supresión de la expresión de genes mediada por el ARNi, depende en gran medida de la cantidad de ARNs que se administre, lo cual puede tener un efecto directo en distintos procesos (Feinberg *et al.*, 2003; Novina y Sharp, 2004; Cheng *et al.*, 2005; Shih y Hunter, 2011), incluyendo la resistencia a infecciones virales en distintas especies (Vanderschuren *et al.*, 2009), como en camarones peneidos (Yodmuang *et al.*, 2006; Saksmerprome *et al.*, 2009). En este sentido, la cantidad de ARNs encapsulado en las VLPs del PstDV1 por medio de choque osmótico supera lo reportado por Sinnuengnong *et al.* (2018) lo que podría generar una respuesta más contundente y aumentar la duración del efecto del silenciamiento de expresión génica. Sin embargo, es necesaria la realización de otros estudios para evaluar el desempeño de este sistema de administración para corroborar dicho impacto.

IX. CONCLUSIONES

- Se determinó que la metodología propuesta por Hou *et al.* (2009) no es apta para su utilización en ensayos donde se requiere obtener la sobreexpresión de PstDV1-CP soluble, ya que se generan cantidades de proteína soluble casi indetectables.
- La metodología propuesta por Gómez-Yanes (2017) para el replegamiento *in-vitro* de la PstDV1-CP a partir de cuerpos de inclusión, genera proteínas recombinantes de alta calidad que mimetizan la estructura de la proteína nativa, que resultan en el ensamblado de VLPs que mantienen las características estructurales propias del virión.
- La utilización de la técnica de choque osmótico para la encapsulación de ARNds en las VLPs del PstDV1, es un método altamente eficiente, que permite recaptar una gran cantidad de ARNds en el interior de las cápsides recombinantes.
- Las VLPs del PstDV1 ensambladas *in vitro* pueden encapsular ARNds y ante la acción de nucleasas, garantizando la entrega del mismo al interior de las células diana, exento de degradación enzimática previa que de otra manera pudiera reducir el efecto e impacto en el organismo.
- La cantidad de ARNds encapsulado en las VLPs del PstDV1 ensambladas *in-vitro* es superior a lo reportada por Sinnuengnong *et al.* (2018), por lo que este sistema es más apto para la entrega eficiente de ARNds
- Por medio de la metodología utilizada para ensamblar VLPs del PstDV1 *in-vitro*, se puede evitar la contaminación de las mismas con biomoléculas procedentes del sistema

de expresión, que pudieran afectar al espécimen tratado. Aunado a que reduce el tiempo y costos asociados a los procesos necesarios para la eliminación de dichas moléculas contaminantes.

X. RECOMENDACIONES

- Es recomendable la evaluación de la efectividad del sistema de entrega de ARNds-*vp28* de manera *in vitro*, de forma que permita dar seguimiento al desarrollo del proceso infeccioso del WSSV en células previamente tratadas con las VLPs del PstDV1 cargadas con ARNds-*vp28*. De esta manera, se puede estimar el impacto en bruto, antes de exponer a las partículas pseudovirales a factores secundarios.
- Se recomienda evaluar la vía óptima de administración del sistema de entrega de ARNds desarrollado, ya que las condiciones a las que se expone a las VLPs cargadas pueden determinar en gran medida el nivel efecto del silenciamiento de expresión génica. Una ruta que pudiera resultar prometedora es mediante la alimentación, ya que una de las vías por medio de la cual se produce la infección en camarones peneidos, es mediante el canibalismo de especímenes infectados.
- Es altamente recomendable llevar a cabo la concentración de las VLPs de manera previa a realizar el fraccionamiento por medio de ultracentrifugación con gradiente de sacarosa. De esta forma, una vez realizado el fraccionamiento, se puede evitar la dispersión de las partículas pseudovirales a través del gradiente mismo, elevando el rendimiento de la purificación.
- En caso de utilizarse las VLPs en estudios de interacción huésped-hospedero en organismos eucariotas, se recomienda ampliamente el uso de un sistema de expresión que promueva la glucosilación de las proteínas recombinantes de manera similar a los mismos, ya que la PstDV1 cuenta con un sitio de miristosilación en el extremo N-terminal. De esta manera, se podría disectar y estudiar a mayor detalle el esquema de interacciones intermoleculares patógeno-hospedero.

- Se recomienda la utilización de un método más sensible para la cuantificación de el ARNds-*vp28* encapsulado, por ejemplo: RT-qPCR. De tal forma, se puede constatar la cantidad de ARNds encapsulado.

XI. REFERENCIAS

- Álvarez-Sánchez, A.R., H. Nolasco-Soria y H. Mejía-Ruíz. 2017. In vitro digestibility of specific dsRNA by enzymes of digestive tract of shrimp *Litopenaeus vannamei*. Digestibilidad in vitro del dsRNA específico por enzimas del tracto. Revista MVZ Córdoba, 22: 5867-5880.
- Anantasomboon, G., R. Poonkhum, N. Sittidilokratna, T.W. Flegel y B. Withyachumnarnkul. 2008. Low viral loads and lymphoid organ spheroids are associated with yellow head virus (YHV) tolerance in whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*. Developmental and Comparative Immunology, 32: 613-626.
- Apiratikul, N., B. Yingyongnarongkul y W. Assavalapsakul. 2013. Highly efficient double-stranded RNA transfection of penaeid shrimp using cationic liposomes. Aquaculture Research, 45: 106-112.
- Aranguren, L.F., M. Salazar, K. Tang, X. Caraballo y D. Lightner. 2013. Characterization of a new strain of Taura syndrome virus (TSV) from Colombian shrimp farms and the implication in the selection of TSV resistant lines. Journal of Invertebrate Pathology, 112: 68-73.
- Ashley, C.E., E.C. Carnes, G.K. Phillips, P.N. Durfee, M.D. Buley, C.A. Lino, D.P. Padilla, B. Phillips, M.B. Carter, C.L. Willman, C.J. Brinker, J. do C. Caldera, B. Chackerian, W. Wharton y D.S. Peabody. 2011. Cell-specific delivery of diverse cargos by bacteriophage MS2 virus-like particles. ACS Nano, 5: 5729-5745.
- Assavalapsakul, W., H. Khanh, T. Kiem, D.R. Smith y S. Panyim. 2014. Silencing of PmYPR65 receptor prevents yellow head virus infection. Virus Research, 189: 133-135.
- Assavalapsakul, W., D.R. Smith y S. Panyim. 2006. Identification and characterization of a *Penaeus monodon* lymphoid cell-expressed receptor for the yellow head virus. Journal of Virology, 80: 262-269.
- Attasart, P., R. Kaewkhaw, C. Chimwai, U. Kongphom, O. Namramoon y Panyi. 2010. Inhibition of *Penaeus vannamei* replication in shrimp by double-stranded RNA. Archives of Virology, 155: 825-832.
- Attasart, P., R. Kaewkhaw, C. Chimwai, U. Kongphom y S. Panyim. 2011. Clearance of *Penaeus vannamei* in naturally pre-infected shrimp by combined ns1 and vp dsRNAs. Virus Research, 159: 79-82.

- Attasart, P., O. Namramoon, U. Kongphom, C. Chimwai y S. Panyim. 2013. Ingestion of bacteria expressing dsRNA triggers specific RNA silencing in shrimp. *Virus Research*, 171: 252-256.
- Bartholomay, L.C., D.S. Loy, J.D. Loy y D.L. Harris. 2012. Nucleic-acid based antivirals : Augmenting RNA interference to ‘ vaccinate ’ *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110: 261-266.
- Berkhout, B. 2018. ScienceDirect RNAi-mediated antiviral immunity in mammals. *Current Opinion in Virology*, 32: 9-14.
- Bhattacharyya, A., A.I.H. Murchie y D.M.J. Lilley. 1990. RNA bulges and the helical periodicity of double-stranded RNA. *Nature*, 343: 484-487.
- Boisvert, M., S. Fernandes y P. Tijssen. 2010. Multiple pathways involved in porcine parvovirus cellular entry and trafficking toward the nucleus. *Journal of Virology*, 84: 7782-7792.
- Bonami, J.R. 2010. Shrimp Viruses, en: Mahy, B.W.J., Van Regenmortel, M.H. V (Eds.), *Desk Encyclopedia of animal and bacterial virology*. Academic Press, p. 617.
- Bonami, J.R., B. Trumper, J. Mari, M. Brehelin y D. V Lightner. 1990. Purification and characterization of the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. *The Journal of General Virology*, 71: 2657-2664.
- Bonner, P.L.R. 2007. *Protein Purification*. Taylor and Francis Group, Nueva York. pp 190.
- Bradley-Dunlop, D.J., C. Pantoja y D. V. Lightner. 2004. Development of monoclonal antibodies for detection of necrotizing hepatopancreatitis in penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 60: 233-240.
- Burton, N.O., K.B. Burkhart y S. Kennedy. 2011. Nuclear RNAi maintains heritable gene silencing in *Caenorhabditis elegans*. *PNAS*, 108: 19683-19688.
- Cárcamo-Aréchiga, N., J.M. Grijalva-Chon, J. Hernández-López, A. Varela-Romero, M.A. López-Torres y L.A. Medina-Juárez. 2016. Mecanismos de defensa de los camarones peneidos durante un proceso infeccioso: una revisión. *Biotecnia*, 13: 32-42.
- Castel, S.E. y R.A. Martienssen. 2013. RNA interference in the nucleus : roles for small RNAs in transcription , epigenetics and beyond. *Nature Reviews: Genetics*, 14: 100-112.
- Castro-Longoria, R., N. Quintero-Arredondo, J.M. Grijalva-Chon y J. Ramos-Paredes. 2008. Detection of the yellow-head virus (YHV) in wild blue shrimp, *Penaeus stylirostris*, from the Gulf of California and its experimental transmission to the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Journal of Fish Diseases*, 31: 953–956.
- Cenik, E.S. y P.D. Zamore. 2011. Argonaute proteins. *Current Biology*, 21: R446-R449.

- Cerenius, L., P. Jiravanichpaisal, H. Liu y I. Söderhäll. 2010a. Crustacean Immunity, en: Söderhäll, K. (Ed.), Invertebrate immunity. Springer Science+Business Media, Austin, p. 316.
- Cerenius, L., B.L. Lee y K. Söderhäll. 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology*, 29: 263-271.
- Chao, C., Y. Yang, M. Wu, M. Chou, C. Fang, M. Lin, C. Tai, C. Shen, P. Chen, D. Chang y M. Wang. 2018. Gene Therapy for human glioblastoma using neurotropic JC virus-like particles as a gene delivery vector. *Scientific Reports*, 8: 2213.
- Charoensapsri, W., P. Sangsuriya, T. Lertwimol, W. Gangnonngiw, K. Phiwsaiya y S. Senapin. 2015. Laminin receptor protein is implicated in hemocyte homeostasis for the whiteleg shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Developmental and Comparative Immunology*, 51: 39-47.
- Chen, C., H.J. Durrant, R.P. Newton y N. a Ratcliffe. 1995. A study of novel lectins and their involvement in the activation of the prophenoloxidase system in *Blaberus discoidalis*. *The Biochemical Journal*, 310: 23-31.
- Chen, L.-S., M. Wang, W. Ou, C. Fung, P. Chen, C.-F. Chang, W. Huang, J. Wang, P.Y. Lin y D. Chang. 2010. Efficient gene transfer using the human JC virus-like particle that inhibits human colon adenocarcinoma growth in a nude mouse model. *Gene Therapy*, 17: 1033-1041.
- Chen, Y., L. Zhao, X. Jia, X. Li, C.Z. Li, H. Yan, S. Weng y J. He. 2012. Isolation and characterization of cDNAs encoding Ars2 and Pasha homologues, two components of the RNA interference pathway in *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 32: 373-380.
- Cheng, G., J. Lin, Y. Shi, Y. Jin, Z. Fu, Y. Jin, Y. Zhou y Y. Cai. 2005. Dose-dependent inhibition of gynecophoral canal protein gene expression in vitro in the schistosome (*Schistosoma japonicum*) by RNA interference. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37: 386-390.
- Chiu, C.-H., Y.-K. Guu, C.-H. Liu, T.-M. Pan y W. Cheng. 2007. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish and Shellfish Immunology*, 23: 364-377.
- Citarasu, T. 2012. Natural antimicrobial compounds for use in aquaculture, *Infectious Disease in Aquaculture: Prevention and Control*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. pp 419-456.
- Combata, A.L., A. Touzé, L. Bousarghin, P.-Y. Sizaret, N. Muñoz y P. Coursaget. 2001. Gene transfer using human papillomavirus pseudovirions varies according to virus genotype and requires cell surface heparan sulfate. *FEMS Microbiology Letters*, 204: 183-188.

- Cotmore, S.F. y P. Tattersall. 2007. Parvoviral Host Range and Cell Entry Mechanisms. *Advances in Virus Research*, 70: 183-232.
- Cotmore, S.F., M. Agbandje-McKenna, J. a Chiorini, D. V Mukha, D.J. Pintel, J. Qiu, M. Soderlund-Venermo, P. Tattersall, P. Tijssen, D. Gatherer y A.J. Davison. 2014. The family Parvoviridae. *Archives of Virology*, 159: 1239-1247.
- Cottrell, T.R. y T.L. Doering. 2003. Silence of the strands : RNA interference in eukaryotic pathogens. *Trends in Microbiology*, 11: 37-43.
- Dana, H., G.M. Chalbatani, H. Mahmoodzadeh, R. Karimloo, O. Rezaiean, A. Moradzadeh, N. Mehmandoost, F. Moazzen, A. Mazraeh, V. Marmari, M. Ebrahimi, M.M. Rashno, S.J. Abadi y E. Gharagouzlo. 2017. Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *International Journal of Biomedical Science*, 13: 48-57.
- Davidson, B.L. y P.B. McCray. 2011. Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nature reviews. Genetics*, 12: 329-340.
- De la Rosa-Vélez, J., Y. Cedano-Thomas, J. Cid-Becerra, J.C. Méndez-Payán, C. Vega-Pérez, J. Zambrano-García y J.R. Bonami. 2006. Presumptive detection of yellow head virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and dot-blot hybridization in. *Journal of Fish Diseases*, 29: 717–726.
- Dhar, A.K., R. Robles-Sikisaka, V. Saksmerprome y D.K. Lakshman. 2014. Biology, genome organization, and evolution of parvoviruses in marine shrimp. *Advances in Virus Research*, 89: 85-139.
- Dhar, A.K., J.A. Cowley, K.W. Hasson y P.J. Walker. 2004. Genomic Organization, Biology y Diagnosis of Taura Syndrome Virus and Yellowhead Virus of Penaeid Shrimp, en: Maramorosch, K., Shatkin, A.J. (Eds.), *Advances in Virus Research*, Vol. 63. Elsevier Academic Press, San Diego, p. 483.
- Dhar, A.K., K.N. Kaizer y D.K. Lakshman. 2010. Transcriptional analysis of *Penaeus stylirostris densovirus* genes. *Virology*, 402: 112-120.
- Ding, S., Q. Han, J. Wang y W. Li. 2018. ScienceDirect Antiviral RNA interference in mammals. *Current Opinion in Immunology*, 54: 109-114.
- Dlakic, M. 2006. DUF283 domain of Dicer proteins has a double-stranded RNA-binding fold. *Bioinformatics*, 22: 2711-2714.
- Durand, S. V y D. V Lightner. 2002. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *Journal of Fish Diseases*, 25: 381-389.
- Durand S., D.V. Lightner, R.M. Redman y J.R. Bonami. 1997. Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 29:205–211

- Edy, V.G., M. Szekely, T. Loviny y C. Dreyer. 1976. Action of nucleases on double-stranded RNA. *European Journal of Biochemistry*, 61: 563-572.
- Erbacher, P., J.-S. Remy y J.-P. Behr. 1999. Gene transfer with synthetic virus-like particles via the integrin-mediated endocytosis pathway. *Gene Therapy*, 6: 138-145.
- Escobedo-Bonilla, C.M., V. Alday-Sanz, M. Wille, P. Sorgeloos y M.B. Pensaert. 2008. Review A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *Journal of Fish Diseases*, 31: 1-18.
- Escobedo-Bonilla, C.M., S. Vega-peña y C.H. Mejía. 2015. Efficacy of double-stranded RNA against white spot syndrome virus (WSSV) non-structural (orf89, wsv191) and structural (vp28, vp26) genes in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of King Saud University*, 27: 182-188.
- FAO. 2018. Fishery and Aquaculture Statistics. Global aquaculture production 1950-2016 (FishstatJ). En: FAO Fisheries and Aquaculture Department [En línea]. Roma. (Última actualización 2018) Accedido (29 ene 2014). URL: www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en
- Feinberg, E.H., C.P. Hunter, E.H. Feinberg y C.P. Hunter. 2003. Transport of dsRNA into Cells by the Transmembrane Protein SID-1. *Science*, 301: 1545-1547.
- Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver y C.C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-strandedRNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806-811.
- Flegel, T.W. 2009. Current Status of Viral Diseases in Asian Shrimp Aquaculture. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidheh*, 61: 228-239.
- Forouhar-Kalkhoran, B. 2017. A Short Review on Virus-Like Particles as Vaccine and Delivery Systems. *Journal of Molecular Biology and Genetics*, 2: 53-59.
- Freire, L.M.S., J.R.C. Filho, C.V.R. Moura, L.E.B. Soledade, L. Stragevitch, Â.M.T.M. Cordeiro, I.M.G. Santos y A.G. Souza. 2012. Evaluation of the oxidative stability and flow properties of quaternary mixtures of vegetable oils for biodiesel production. *Fuel*, 95: 126-130.
- Gagnon, K.T., L. Li, Y. Chu, B.A. Janowski y D.R. Corey. 2014. RNAi actors are present and active in human cell nuclei. *Cell Reports*, 6: 211-221.
- Garcea, R.L. y L. Gissmann. 2004. Virus-like particles as vaccines and vessels for the delivery of small molecules. *Current Opinion in Biotechnology*, 15: 513-517.
- Gaur, R.K., T. Hohn y P. Sharma. 2014. Plant virus – host interaction: Molecular approaches and viral interaction. Academic Press, Waltham. pp 1-16.

- Georgens, C., J. Weyermann y A. Zimmer. 2005. Recombinant virus like particles as drug delivery system. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 40: 49-55.
- Gias, E., S.U. Nielsen, L.A.F. Morgan y G.L. Toms. 2008. Purification of human respiratory syncytial virus by ultracentrifugation in iodixanol density gradient. *Journal of Virological Methods*, 147: 328-332.
- Goh, Z.H., S.G. Tan, S. Bhasu y W.S. Tan. 2011. Virus-like particles of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus produced in bacteria. *Journal of Virological Methods*, 175: 74-79.
- Gómez-Yanes, A.C. 2017. Producción y aplicación biomédica de partículas pseudo-virales recombinantes derivadas del Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (IHHNV) para inhibir la replicación del Virus de la Mancha Blanca (WSSV). Universidad de Sonora.
- González-Ballarín, B., E. Bech-Nielsen, T. Bo-Thomsen y H. Kenneth. 2013. Mucosal delivery of RNAi therapeutics, en: Howard, K.A. (Ed.), *RNA interference from biology to therapeutics*. Springer, Nueva York, pp. 97-127.
- Green, T.J. y P. Speck. 2018. antiviral defense and innate immune memory in the oyster. *Viruses*, 10: 1-11.
- Green, V.A. y M.S. Weinberg. 2011. Small RNA-induced transcriptional gene regulation in mammals: Mechanisms, therapeutic applications, and a scope within the genome, en: Grimm, D. (Ed.), *Cellular RNA interference mechanisms*, volume 102. Academic Press, pp. 12-46.
- Grijalva-Chon, J.M. y R. Castro-Longoria. 2015. Viral threats in aquaculture: The battle continues. *Journal of Virology and Antiviral Research*, 4: 1000e107.
- Guoxing Z., S. Yalin, Z. Kai y C. Zhi. 1997. Bacilliform virus infection in cultured Chinese shrimp, *Penaeus orientalis*, in China. *Journal of Marine Biotechnology*, 5:113–118.
- Hammond, S.M. 2005. Dicing and slicing The core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Letters*, 579: 5822-5829.
- Haq, M.A.B., R. Vignesh y M. Srinivasan. 2012. Deep insight into white spot syndrome virus vaccines : A review. *Asian Pacific. Journal of Tropical Disease*, 2: 73-77.
- Harbison, C.E., J. a Chiorini y C.R. Parrish. 2008. The parvovirus capsid odyssey: from the cell surface to the nucleus. *Trends in Microbiology*, 16: 208-214.
- Hasson, K.W., D. V. Lightner, B.T. Poulos, R.M. Redman, B.L. White, J.A. Brock y J.R. Bonami. 1995. Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: Demonstration of a viral etiology. *Diseases of Aquatic Organisms*, 23: 115-126.

- Hasson K.W., Y. Fan, T. Reisinger, J. Venuti., P.W. Varner. 2006. White-spot syndrome virus (WSSV) introduction into the Gulf of Mexico and Texas freshwater systems through imported, frozen baitshrimp, *Diseases of Aquatic Organisms*, 71:91–100.
- Haussecker, D. 2014. Current issues of RNAi therapeutics delivery and development. *Journal of Controlled Release*, 195: 49-54.
- Hauton, C. 2012. The scope of the crustacean immune system for disease control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110: 251-260.
- He, L., G.J. Hannon y C.S. Harbor. 2004. MicroRNAs : Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews: Genetics*, 5: 522.531.
- Ho, T., P. Yasri, S. Panyim y A. Udomkit. 2011. Double-stranded RNA confers both preventive and therapeutic effects against *Penaeus stylirostris densovirus* (PstDNV) in *Litopenaeus vannamei*. *Virus Research*, 155: 131-136.
- Hoffmann, D.B., K.O. Böker, S. Schneider, E. Eckermann-felkl, A. Schuder, M. Komrakova, S. Sehmisch y J. Gruber. 2016. In vivo siRNA delivery using JC virus-like particles decreases the expression of RANKL in rats. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 5: e298.
- Hong, X., L. Lu y D. Xu. 2016. Progress in research on acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture International*, 24: 577-593.
- Hou, L., H. Wu, L. Xu y F. Yang. 2009. Expression and self-assembly of virus-like particles of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in *Escherichia coli*. *Archives of Virology*, 154: 547-553.
- Huang C.H., L.R. Zhang, J.H. Zhang, L.H. Xiao, Q.J. Wu y D.H. Chen, J.K.K. Li. 2001. Purification and characterization of white spot syndrome virus (WSSV) produced in an alternate host: crayfish, *Cambarus clarkii*, *Virus Research*, 76:115–125.
- Huang, L.-Y., S. Halder y M. Agbandje-McKenna. 2014. Parvovirus glycan interactions. *Current Opinion in Virology*, 7: 108-118.
- Huang, S.Y., M.Y. Chen, E.C. Lin, H.L. Tsou, Y.H. Kuo, C.C. Ju y W.C. Lee. 2002. Effects of single nucleotide polymorphisms in the 5'-flanking region of heat shock protein 70.2 gene on semen quality in boars. *Animal Reproduction Science*, 70: 99-109.
- Huvenne, H. y G. Smagghe. 2010. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control : A review. *Journal of Insect Physiology*, 56: 227-235.
- Itsathitphaisarn, O., S. Thitamadee, W. Weerachatanukul y K. Sritunyalucksana. 2017. Potential of RNAi applications to control viral diseases of farmed shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*, 147: 76-85.
- Iwasaki, Y.W., M.C. Siomi y H. Siomi. 2015. PIWI-Interacting RNA : Its Biogenesis and

functions. Annual Review of Biochemistry, 84: 405-433.

- Jariyapong, P., C. Chotwiwatthanakun, S. Direkbusarakom, I. Hirono, S. Wuthisuthimethavee y W. Weerachayanukul. 2015a. Delivery of double stranded RNA by *Macrobrachium rosenbergii nodavirus*-like particles to protect shrimp from white spot syndrome virus. Aquaculture, 435: 86-91.
- Jariyapong, P., C. Chotwiwatthanakun, M. Somrit, S. Jitrapakdee, L. Xing, H.R. Cheng y W. Weerachayanukul. 2014. Encapsulation and delivery of plasmid DNA by virus-like nanoparticles engineered from *Macrobrachium rosenbergii nodavirus*. Virus Research, 179: 140-146.
- Jariyapong, P., W. Weerachayanukul, S. Direkbusarakom, I. Hirono, S. Wuthisuthimethavee y C. Chotwiwatthanakun. 2015b. Enhancement of shrimp immunity against white spot syndrome virus by *Macrobrachium rosenbergii nodavirus*-like particle encapsulated VP28 double-stranded RNA. Aquaculture, 446: 325-332.
- Jin, Z. y W.S. El-Deiry. 2005. Overview of cell death signaling pathways. Cancer Biology and Therapy, 4: 139-163.
- Jinek, M. y J.A. Doudna. 2009. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. Nature, 457: 405-412.
- Jiravanichpaisal, P., B.L. Lee y K. Söderhäll. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. Immunobiology, 211: 213-236.
- Johansson, M.W., P. Keyser, K. Sritunyaluksana y K. Söderhäll. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. Aquaculture, 191: 45-52.
- Johnson, F. y E. Dudleenamjil. 2012. Clathrin-associated endocytosis as a route of entry into cells for parvoviruses, en: Ceresa, B. (Ed.), Molecular regulation of endocytosis. InTech, p. 466.
- Johnson, P.H. 2011. RNA interference: Application to drug discovery and dhallenges to pharmaceutical development. Wiley Blackwell, Nueva Jersey. pp 310.
- Johnson, P.H., D. Frank, K. Cui, R. Adami, H. Wang, M. Houston y S.C. Quay. 2011. Discovery of new siRNA delivery agents, en: Johnson, P.H. (Ed.), RNA interference: Application to drug discovery and challenges to pharmaceutical development. Wiley Blackwell, Nueva Jersey, pp. 125-173.
- Kalagayan, H., D. Godin, R. Kanna, G. Hagino, J. Sweeney y J. Wyban. 1991. IHHN Virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome (RDS) of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. Journal of the World Aquaculture Society, 22: 235-243.
- Kalantari, R., C. Chiang y D.R. Corey. 2016. Regulation of mammalian transcription and

- splicing by nuclear RNAi. *Nucleic Acids Research*, 44: 524-537.
- Kalantari, R., J.A. Hicks, L. Li, K.T. Gagnon, V. Sridhara, A. Lemoff, H. Mirzaei y D.R. Corey. 2016b. Stable association of RNAi machinery is conserved between the cytoplasm and nucleus of human cells. *RNA*, 22: 1-14.
- Kaufmann, B., V.D. Bowman, Y. Li, J. Szelei, P.J. Waddell, P. Tijssen y M.G. Rossmann. 2010. Structure of *Penaeus stylirostris* densovirus, a shrimp pathogen. *Journal of Virology*, 84: 11289-11296.
- Kaufmann, B., M. El-Far, P. Plevka, V.D. Bowman, Y. Li, P. Tijssen y M.G. Rossmann. 2011. Structure of *Bombyx mori* densovirus 1, a silkworm pathogen. *Journal of Virology*, 85: 4691-4697.
- Kawashima, T. y N.M. Tsuji. 2018. Double-stranded RNA derived from lactic acid bacteria augments Th1 immunity via interferon- β from human dendritic cells. *Frontiers in Immunology*, 9: 1-10.
- Kemp, C., S. Mueller, A. Goto, S. Paro, F. Bonnay, C. Dostert, L. Troxler, C. Hetru, C. Meignin, J.A. Hoffmann y J. Imler. 2013. Broad RNA Interference – Mediated Antiviral Immunity and Virus-Specific Inducible Responses in *Drosophila*. *The Journal of Immunology*, 190: 650-658.
- Khadijah, S., S.Y. Neo, M.S. Hossain, L.D. Miller, S. Mathavan y J. Kwang. 2003. Identification of White Spot Syndrome Virus latency-related genes in specific-pathogen-free shrimps by use of a microarray. *Journal of Virology*, 77: 10162-10167.
- Kiatmetha, P., C. Chotwiwatthanakun, P. Jariyapong, W. Santimanawong, P. Ounjai y W. Weerachatanukul. 2018. Nanocontainer designed from an infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) has excellent physical stability and ability to deliver shrimp tissues. *PeerJ*, 6: e6079.
- Kim, H.R., I.K. Kim, K.H. Bae, S.H. Lee, Y. Lee y T.G. Park. 2008. Cationic solid lipid nanoparticles reconstituted from low density lipoprotein components for delivery of siRNA. *Molecular Pharmaceutics*, 5: 622-631.
- Kim, S.C., Z. Kosuke, K.Y. Nam, S.K. Kiim y K.H. Kim. 2007. Protection of shrimp (*Penaeus chinensis*) against white spot syndrome virus (WSSV) challenge by double-stranded RNA. *Fish and Shellfish Immunology*, 23: 242-246.
- Kobayashi, H. y Y. Tomari. 2015. RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *BBA - Gene Regulatory Mechanisms*, 1850: 71-81.
- Kole, R., A.R. Krainer y S. Altman. 2012. RNA therapeutics : beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nature reviews. Drug discovery*, 11: 125-140.
- Kolliopoulou, A., C.N.T. Taning, G. Smaghe y L. Swevers. 2017. Viral delivery of dsRNA for

- control of insect agricultural pests and vectors of human disease: Prospects and challenges. *Frontiers in Physiology*, 8: 1-24.
- Krishnan, P., K. V Rajendran y A. Chaudhari. 2009. RNA therapeutics for shrimp viral diseases. *Diseases of Aquatic Organisms*, 86: 263-272.
- Kurzynska-Kokorniak, A., M. Pokornowska, N. Koralewska, W. Hoffmann, K. Bienkowska-Szewczyk y M. Figlerowicz. 2016. Revealing a new activity of the human Dicer DUF283 domain in vitro. *Scientific Reports*, 6: 1-13.
- Kushnir, N., S.J. Streatfield y V. Yusibov. 2012. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*, 31: 58-83.
- Kwak, P.B. y Y. Tomari. 2012. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nature Structural and Molecular Biology*, 19: 145-152.
- La Fauce, K.A. y L. Owens. 2009. RNA interference reduces PmergDNV expression and replication in an in vivo cricket model. *Journal of Invertebrate Pathology*, 100: 111-115.
- Lai, H., T. Hann, M. Ando, C. Lee, I. Chen, Y. Chiang, H. Takeyama, H. Hamaguchi, C. Lo, T. Aoki y H. Wang. 2015. Fish and shell fish immunology pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, 47: 1006-1014.
- Lafferty, K.D., C.D. Harvell, J.M. Conrad, C.S. Friedman, M.L. Kent, A.M. Kuris, E.N. Powell, D. Rondeau, y S.M. Saksida. 2015. Infectious Diseases Affect Marine Fisheries and Aquaculture Economics. *Annual Review of Marine Science*, 7: 471-496.
- Lau, P., K.Z. Guiley, N. De, C.S. Potter, B. Carragher y I.J. Macrae. 2012. The molecular architecture of human Dicer. *Nature Publishing Group*, 19: 436-440.
- Li, F. y J. Xiang. 2013. Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, 34: 973-980.
- Li, F. y J. Xiang. 2012. Recent advances in researches on the Innate Immunity of shrimp in China. *Developmental and Comparative Immunology*, 39: 11-26.
- Li, X., X. Meng, S. Luan, K. Luo, B. Cao, B. Chen y J. Kong. 2018. Isolation and characterization of a Raf gene from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* in response to white spot syndrome virus infection Xupeng. *Fish and Shellfish Immunology*, 83: 341-347.
- Li, Z., Q. Lin, J. Chen, J. L. Wu, T. K. Lim, S. S. Loh, X. Tang y C.-L. Hew. 2007. Shotgun identification of the structural proteome of shrimp white spot syndrome virus and iTRAQ differentiation of envelope and nucleocapsid subproteomes. *Molecular and Cellular Proteomics*, 6: 1609-1620.

- Lightner, D. V. 2011. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106: 110-30.
- Lightner, D. V, R.M. Redman, K.W. Hasson y C.R. Pantoja. 1995. Taura syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda): gross signs , histopathology and ultrastructure. *Diseases of Aquatic Organisms*, 21: 53-59.
- Liu, H., K. Söderhäll y P. Jiravanichpaisal. 2009. Antiviral immunity in crustaceans. *Fish and Shellfish Immunology*, 27: 79-88.
- Liu, Q. 2003. R2D2 , a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science*, 301: 1921-1925.
- Liu, W., H. Shiung, C. Lo, J. Leu, Y. Lai, T. Lee, W. Huang, G. Kou y Y. Chang. 2014. Characterization and interactome study of White Spot Syndrome Virus envelope protein VP11. *PLOS One*, 9: e85779.
- Liu, H., P. Jiravanichpaisal, I. Söderhäll, L. Cerenius y K. Söderhäll. 2006a. Antilipopolysaccharide factor interferes with white spot syndrome virus replication in vitro and in vivo in the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of virology*, 80: 10365-10371.
- Liu, X., F. Jiang, S. Kalidas, D. Smith y Q. Liu. 2006b. Dicer-2 and R2D2 coordinately bind siRNA to promote assembly of the siRISC complexes. *RNA*, 12: 1514-1520.
- Lodhi, K.M., M.A. Lodhi, S. Burgado, P. Petty, R. Bazzelle y R.L. Grier. 2010. Comparison of denaturing and non-denaturing gel electrophoresis methods for RNA analysis. *Pakistan Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 43: 159-161.
- Lo, C.F., C.H. Ho, C.H. Chen, K.F. Liu, Y.L. Chiu, P.Y. Yeh, S.E. Peng, H.C. Hsu, H.C. Liu, C.F. Chang, M. Sen Su, C.H. Wang y G.H. Kou. 1997. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Diseases of Aquatic Organisms*, 30: 53-72.
- Lotz, J.M. y M.A. Soto. 2002. Model of white spot syndrome virus (WSSV) epidemics in *Litopenaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 50: 199-209.
- Loy, D.S. 2014. Host-virus interactions in the Pacific white shrimp , *Litopenaeus vannamei*. Iowa State University. pp 147.
- Loy, J.K., P.F. Frelier, P. Varner y J.W. Templeton. 1996. Detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in cultured *Penaeus vannamei* from Texas and Peru by polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms*, 25: 117-122.
- Lu C.P., S. Zhu. F.S. Guo y S.Y. Wu. 1997. Electron microscopic observation on a non-occluded baculolike virus in shrimps, *Archives of Virology*, 142:2073–2078.
- Lua, L.H.L., N.K. Connors, F. Sainsbury, Y.P. Chuan, N. Wibowo y A.P.J. Middelberg. 2013.

- Bioengineering virus-like particles as vaccines. *Biotechnology and Bioengineering*, 111: 425-440.
- Ma, Y.J., G.A. Dissen, F. Rage y S.R. Ojeda. 1996. RNase protection assay. *Methods*, 10: 273-278.
- Macrae, I.J., I.J. Macrae, K. Zhou, F. Li, A. Repic, A.N. Brooks, W.Z. Cande, P.D. Adams y J.A. Doudna. 2012. Structural basis for double-stranded rna processing by Dicer. *Science*, 311: 195-197.
- Majekodunmi, S.O. 2015. A review on centrifugation in the pharmaceutical industry. *American Journal of Biomedical Engineering*, 5: 67-78.
- Mari, J., B.T. Poulos, D. V Lightner y J. Bonami. 2002. Shrimp Taura syndrome virus : genomic characterization and similarity with members of the genus Cricket paralysis-like viruses. *Journal of General Virology*, 83: 915-926.
- Marks, H., R.W. Goldbach, J.M. Vlak y M.C.W. Van Hulten. 2004. Genetic variation among isolates of White spot syndrome virus. *Archives of Virology*, 149: 673-697.
- Marques, M.R.F. y M.A. Barracco. 2000. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. *Aquaculture*, 191: 23-44.
- Marraffini, L.A. y E.J. Sontheimer. 2010. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Reviews: Genetics*, 11: 181-190.
- Martínez-Córdova, L.R., M. Martínez-Porchas y E. Cortés-Jacinto. 2009. Camaronicultura mexicana y mundial: ¿Actividad sustentable o industria contaminante? *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 25: 181-196.
- Martorelli, S.R., R.M. Overstreet y J.A. Jovonovich. 2010. First report of viral pathogens WSSV and IHHNV in argentine crustaceans. *Bulletin of Marine Science*, 86: 117-131.
- Meister, G. y T. Tuschl. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431: 343-349.
- Merten, O.W. y B. Gaillet. 2016. Viral vectors for Gene Therapy and gene modification approaches. *Biochemical Engineering Journal*, 108: 98-115.
- Mierlo, J.T. van, K.W.R. van Clee y R.P. Van Rij. 2011. Defense and counterdefense in the rna-based antiviral immune system in insects, en: Rij, R.P. Van (Ed.), *Antiviral RNAi: Concepts, methods, and applications*. *Methods in molecular biology*, vol. 721. Humana Press, Nueva York, pp. 3-22.
- Modrow, S., T. Uwe, D. Falke y H. Schätzl. 2013. *Molecular virology*. Springer-Verlag, New York, NY. pp 1016.

- Mohr, P.G., N.J.G. Moody, J. Hoad, L.M. Williams, R.O. Bowater, D.M. Cummins, J.A. Cowley y M.S. Crane. 2015. New yellow head virus genotype (YHV7) in giant tiger shrimp *Penaeus monodon* indigenous to northern Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 115: 263-268.
- Mohsen, M.O., L. Zha, G. Cabral-Miranda y M.F. Bachmann. 2017. Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Seminars in Immunology*, 34: 123-132.
- Møller-Larsen, A. y T. Christensen. 1998. Isolation of a retrovirus from multiple sclerosis patients in self-generated Iodixanol gradients. *Journal of Virological Methods*, 73: 151-161
- Motte, E., E. Yugcha, J. Luzardo, F. Castro, P. Miranda, O. Borja, G. Leclercq, J. Rodrı, J. Serrano, M. Terreros, K. Montalvo, A. Narva, E. Mialhe y V. Boulo. 2003. Prevention of IHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 219: 57-70.
- Murgia, M.V. 2012. Studies on turkey parvoviruses. The Ohio State University.
- Musthaq, S.K. y J. Kwang. 2014. Evolution of specific immunity in shrimp – A vaccination perspective against White Spot Syndrome Virus. *Developmental and Comparative Immunology*, 46: 279-290.
- Nayerossadat, N., P. Ali y T. Maedeh. 2012. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Advanced Biomedical Research*, 1: 1-11.
- Negrete, A., A. Pai y J. Shiloach. 2014. Use of hollow fiber tangential flow filtration for the recovery and concentration of HIV virus-like particles produced in insect cells. *Journal of Virological Methods*, 195: 240-246.
- Nguyen, V.D., O. Christiaens, P. Bossier y G. Smagghe. 2016. RNA interference in shrimp and potential applications in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 10: 573-584.
- Nguyen, V.D., O. Christiaens, D. Le Van Bao, S. De Vos, T.H. MacRae, G. Smagghe y P. Bossier. 2019. Identification of RNAi-related genes and transgenerational efficiency of RNAi in *Artemia franciscana*. *Aquaculture*, 501: 285-292.
- Ni, R., J. Zhou, N. Hossain y Y. Chau. 2016. Virus-inspired nucleic acid delivery system: Linking virus and viral mimicry. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 106: 3-26.
- Novina, C.D. y P.A. Sharp. 2004. The RNAi revolution. *Nature*, 430: 161-164.
- Oidtmann, B. y G.D. Stentiford. 2011. White Spot Syndrome Virus (WSSV) concentrations in crustacean tissues - a review of data relevant to assess the risk associated with commodity trade. *Transboundary and Emerging Diseases*, 58: 469-482.

- Oliveira, S., G. Storm y R.M. Schiffelers. 2006. Targeted delivery of siRNA. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2006: 1-9.
- Overstreet, R., D. Lightner, K. Hasson, S. McIlwain y J. Lotz. 1997. Susceptibility to Taura syndrome virus of some penaeid shrimp species native to the Gulf of Mexico and the southeastern United States. *Journal of Invertebrate Pathology*, 69: 165-176.
- Peng, Y., K. Wang, W. Fu, C. Sheng y Z. Han. 2018. Biochemical comparison of dsRNA degrading nucleases in four different insects. *Frontiers in Physiology*, 9: 1-14.
- Posiri, P., C. Ongvarrasopone y S. Panyim. 2013. A simple one-step method for producing dsRNA from *E. coli* to inhibit shrimp virus replication. *Journal of Virological Methods*, 188: 64-69.
- Prabha, S., R. Vyas, N. Gupta, B. Ahmed, R. Chandra y S. Nimesh. 2015. RNA interference technology with emphasis on delivery vehicles—prospects and limitations. *Artificial Cells, nanomedicine, and biotechnology*, 44: 1-9.
- Prapavorarat, A., S. Pongsomboon y A. Tassanakajon. 2010. Identification of genes expressed in response to yellow head virus infection in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, by suppression subtractive hybridization. *Developmental and Comparative Immunology*, 34: 611-617.
- Rai, P., M.P. Safeena, K. Krabsetsve, K. La Fauce, L. Owens y I. Karunasagar. 2012. Genomics, molecular epidemiology and diagnostics of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. *Indian Journal of Virology*, 23: 203-214.
- Ravi, M., A. Nazeer Basha, M. Sarathi, H.H. Rosa Idalia, J. Sri Widada, J.R. Bonami y A.S. Sahul Hameed. 2009. Studies on the occurrence of white tail disease (WTD) caused by MrNV and XSV in hatchery-reared post-larvae of *Penaeus indicus* and *P. monodon*. *Aquaculture*, 292: 117-120.
- Robalino, J., T. Bartlett, E. Shepard, G. Jaramillo, E. Scura, W. Robert, P.S. Gross, C.L. Browdy, W. Gregory, S. Prior, R.W. Chapman 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.
- Robalino, J., C.L. Browdy, S. Prior, P. Parnell, P. Gross, G. Warr y A. Metz. 2004. Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. *Journal of Virology*, 78: 10442-10448.
- Robles-Sikisaka, R., A.J. Bohonak, L.R. McClenaghan y A.K. Dhar. 2010. Genetic signature of rapid IHNV (infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus) expansion in wild *Penaeus* shrimp populations. *PLOS One*, 5: e11799.

- Robles-Sikisaka, R., D.K. Garcia, K.R. Klimpel, y A.K. Dhar. 2001. Nucleotide sequence of 3'-end of the genome of Taura syndrome virus of shrimp suggests that it is related to insect picornaviruses. *Archives of Virology*, 146: 941-952.
- Rohovie, M.J., M. Nagasawa y J.R. Swartz. 2017. Virus-like particles: Next-generation nanoparticles for targeted therapeutic delivery. *Bioengineering and Translational Medicine*, 2: 43-57.
- Rossmann, M.G. 1989. The canyon hypothesis. Hiding the host cell receptor attachment site on a viral surface from immune surveillance. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 14587-14590.
- Roy, P. y R. Noad. 2008. Virus-like particles as a vaccine delivery system: Myths and facts. *Human Vaccines*, 4: 5-12.
- Sabin, L.R., Q. Zheng, P. Thekkat, J. Yang, G.J. Hannon, B.D. Gregory, M. Tudor y S. Cherry. 2013. Dicer-2 processes diverse viral RNA species. *PLOS One*, 8: e55458.
- Sabin, L.R., R. Zhou, J.J. Gruber, N. Lukinova, S. Bambina, A. Berman, C. Lau, C.B. Thompson y S. Cherry. 2009. Ars2 Regulates both miRNA- and siRNA- dependent silencing and suppresses RNA virus infection in *Drosophila*. *Cell*, 138: 340-351.
- Saksmerprome, V., P. Charoonnart y T.W. Flegel. 2017. Feasibility of dsRNA treatment for post-clearing SPF shrimp stocks of newly discovered viral infections using Laem Singh virus (LSNV) as a model. *Virus Research*, 235: 73-76.
- Saksmerprome, V., P. Charoonnart, W. Gangnonngiw y B. Withyachumnarnkul. 2009. A novel and inexpensive application of RNAi technology to protect shrimp from viral disease. *Journal of Virological Methods*, 162: 213-217.
- Saksmerprome, V., T. Thammasorn y S. Jitrakorn. 2013. Using double-stranded RNA for the control of Laem-Singh Virus (LSNV) in Thai *P. monodon*. *Journal of Biotechnology*, 164: 449-453.
- Saleh, M., R.P. Van Rij, A. Hekele, A. Gillis, E. Foley, P.H.O. Farrell y R. Andino. 2006. The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. *Nature Cell biology*, 8: 793-801.
- Sánchez-Barajas, M., M.A. Liñan-Cabello y A. A. Mena-Herrera. 2009. Detection of yellow-head disease in intensive freshwater production systems of *Litopenaeus vannamei*. *International*, 17: 101-112.
- Sánchez-Martínez, J.G., G. Aguirre-Guzmán y H. Mejía-Ruíz. 2007. White spot syndrome virus in cultured shrimp: A review. *Aquaculture Research*, 38: 1339-1354.
- Sánchez-Paz, A. 2010. Review article White spot syndrome virus: An overview on an emergent concern. *Veterinary Research*, 41: 1-26.

- Sánchez-Paz, A., A. Muhlia-Almazan, R. Saborowski, F. García-Carreño, G. Sablok y F. Mendoza-Cano. 2014. Marine viruses: the beneficial side of a threat. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174: 2368-2379.
- Sánchez-Paz, A., R. Sotelo-Mundo, y A. Muhila-Almazán. 2012. The challenges of developing a treatment that fully protects shrimp against WSSV infection: A perspective. *Advances in Zoology Research*, 1: 30.
- Sánchez-Rodríguez, S.P., L. Münch-Anguiano, O. Echeverría, G. Vázquez-Nin, M. Mora-Pale, J.S. Dordick y I. Bustos-Jaimes. 2012. Biochimie Human parvovirus B19 virus-like particles : In vitro assembly and stability. *Biochimie*, 94: 870-878.
- Sánchez-Rodríguez, S.P., J.V. Enríquez-Avila, J.M. Soto-Fajardo, C. Peña-Montes y I. Bustos-Jaimes. 2015. In vitro encapsulation of heterologous dsDNA into human parvovirus B19 virus-like particles. *Molecular Biotechnology*, 57: 309-317.
- Sanitt, P., N. Apiratikul, N. Niyomtham, B. Yingyongnarongkul, W. Assavalapsakul, S. Panyima y A. Udomkit. 2016. Cholesterol-based cationic liposome increases dsRNA protection of yellow head virus infection in *Penaeus vannamei*. *Journal of Biotechnology*, 228: 95-102.
- Sanitt, P., P. Attasart y S. Panyim. 2014. Protection of yellow head virus infection in shrimp by feeding of bacteria expressing dsRNAs. *Journal of Biotechnology*, 179: 26-31.
- Sarathi, M., M.C. Simon, V.P.I. Ahmed, S.R. Kumar y A.S.S. Hameed. 2007. Silencing VP28 gene of White Spot Syndrome Virus of shrimp by bacterially expressed dsRNA. *Marine Biotechnology*, 10: 198-206.
- Sarathi, M., M.C. Simon, C. Venkatesan y A.S. Sahul-Hameed. 2008. Oral administration of bacterially expressed VP28dsRNA to protect *Penaeus monodon* from White Spot Syndrome Virus. *Marine Biotechnology*, 10: 242-249.
- Schneider-Schaulies, J. 2000. Cellular receptors for viruses: links to tropism and pathogenesis. *The Journal of General Virology*, 81: 1413-1429.
- Schwarz, B. y T. Douglas. 2015. Development of virus-like particles for diagnostic and prophylactic biomedical applications. *Wiley interdisciplinary reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 7: 722-735.
- Sellars, M.J., J.A. Cowley, D. Musson, M. Rao, M.L. Menzies, G.J. Coman y B.S. Murphy. 2019. *Aquaculture*, 499: 160-116.
- Sellars, M.J., M. Rao, S.J. Arnold, N.M. Wade y J.A. Cowley. 2011. *Penaeus monodon* is protected against gill- associated virus by muscle injection but not oral delivery of bacterially expressed dsRNAs. *Diseases of Aquatic Organisms*, 95: 19-30.
- Senapin, S., C. Jaengsanong, K. Phiwsaiya, S. Prasertsri, K. Laisutisan, N. Chuchird, C.

- Limsuwan y T.W. Flegel. 2012. Infections of MrNV (*Macrobrachium rosenbergii* nodavirus) in cultivated whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* in Asia. *Aquaculture*, 338-341: 41-46.
- Senapin, S., K. Phiwsaiya, G. Anantasomboon, T. Sriphajit, C.L. Browdy y T.W. Flegel. 2010. Knocking down a Taura syndrome virus (TSV) binding protein Lamr is lethal for the whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 29: 422-429.
- Senapin, S., K. Phiwsaiya, W. Gangnonngiw, M. Briggs, P. Sithigorngul y T.W. Flegel. 2013. Dual infections of IMNV and MrNV in cultivated *Penaeus vannamei* from Indonesia. *Aquaculture*, 372-375: 70-73.
- Senapin, S. y A. Phongdara. 2006. Binding of shrimp cellular proteins to Taura syndrome viral capsid proteins VP1, VP2 and VP3. *Virus Research*, 122: 69-77.
- Seow, Y. y M.J. Wood. 2009. Biological gene delivery vehicles: beyond viral vectors. *Molecular Therapy*, 17: 767-777.
- Shekhar, M.S. y A.G. Ponniah. 2014. Recent insights into host – pathogen interaction in white spot syndrome virus infected penaeid shrimp. *Journal of Fish Diseases*, 38: 599-612.
- Sheu-gruttadauria, J. y I.J. Macrae. 2017. Structural foundations of RNA silencing by argonaute. *Journal of Molecular Biology*, 429: 2619-2639.
- Shih, J.D. y C.P. Hunter. 2011. SID-1 is a dsRNA-selective dsRNA-gated channel. *RNA*, 17: 1-10.
- Shike, H., A.K. Dhar, J.C. Burns, C. Shimizu, F.X. Jousset, K.R. Klimpel y M. Bergoin. 2000. Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus of shrimp is related to mosquito brevidensoviruses 1. *Virology*, 277: 167-177.
- Shim, G., M. Kim, J.Y. Park y Y. Oh. 2013. Application of cationic liposomes for delivery of nucleic acids. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8: 72-80.
- Shirbaghaee, Z. y A. Bolhassani. 2016. Different applications of virus-like particles in biology and medicine: Vaccination and delivery systems. *Biopolymers*, 105: 113-132.
- Shukla, J.N., M. Kalsi, A. Sethi, K.E. Narva, E. Fishilevich, S. Singh, K. Mogilicherlaa y S.R. Palli. 2016. Reduced stability and intracellular transport of dsRNA contribute to poor RNAi response in lepidopteran insects. *RNA Biology*, 13: 656-669.
- Sigova, A. y P.D. Zamore. 2008. Small RNA Silencing Pathways, en: Crooke, S.T. (Ed.), *Antisense drug technology: Principles, strategies and applications*. CRC Press LCC, Boca Raton, pp. 75-88.
- Simiano-Tavares, K.S., R. de Mello-Pinho, I. de S. Carneiro, L.H. de Aguiar, C.E.M. Calderón, L.T. Martins, C.E. Ambrósio, E.A. Maga, M. Bertolini, J.D. Muray y L.R. Bertolini. 2012.

- Efficient RNAi-induced protein knockdown in somatic cells using diced or chemically produced small interfering RNAs (siRNA). *Acta Scientiae Veterinariae*, 40: 1-11.
- Singh, P., G. Destito, A. Schneemann y M. Manchester. 2006. Canine parvovirus-like particles, a novel nanomaterial for tumor targeting. *Journal of Nanobiotechnology*, 4: 1-11.
- Sinnuengnong, R., P. Attasart, D.R. Smith, S. Panyim y W. Assavalapsakul. 2017. In vitro assembly of *Penaeus vannamei* (PmDENV)-like particles produced in a prokaryote expression system. *Aquaculture Research*, 48: 4975-4981.
- Sinnuengnong, R., P. Attasart, D.R. Smith y S. Panyim. 2018. Administration of co-expressed *Penaeus stylirostris densovirus*-like particles and dsRNA-YHV-Pro provide protection against yellow head virus in shrimp. *Journal of Biotechnology*, 267: 63-70.
- Siomi, H. y M.C. Siomi. 2009. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*, 457: 396-404.
- Sorrentino, S., M. Naddeo, A. Russo y G.D. Alessio. 2003. Degradation of double-stranded RNA by human pancreatic ribonuclease: Crucial role of noncatalytic basic amino acid residues. *Biochemistry*, 42: 10182-10190.
- Soto-Rodriguez, S.A., B. Gomez-Gil, R. Lozano-Olvera, M. Betancourt-Lozano y M.S. Morales-Covarrubias. 2015. Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 81: 1689-1699.
- Sritunyalucksana, K., W. Wannapapho, C.F. Lo, y T.W. Flegel. 2006. PmRab7 is a VP28-binding protein involved in white spot syndrome virus infection in shrimp. *Journal of Virology*, 80: 10734-42.
- Stentiford, G.D., J.R. Bonami y V. Alday-Sanz. 2009. A critical review of susceptibility of crustaceans to Taura syndrome, Yellowhead disease and White Spot Disease and implications of inclusion of these diseases in European legislation. *Aquaculture*, 291: 1-17.
- Strobel, B., F.D. Miller, W. Rist y T. Lamla. 2015. Comparative analysis of cesium chloride- and iodixanol-based purification of recombinant adeno-associated viral vectors for preclinical applications. *Human Gene Therapy methods*, 26: 147-157.
- Sudhakaran, R., P. Haribabu, S. Rajesh Kumar, M. Sarathi, V.P. Ishaq Ahmed, V. Sarath Babu, C. Venkatesan y A.S. Sahul Hameed. 2008. Natural aquatic insect carriers of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 79: 141-145.
- Sudhakaran, R., V. Parameswaran y a. S. Sahul Hameed. 2007. In vitro replication of

- Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus in C6/36 mosquito cell line. *Journal of Virological Methods*, 146: 112-118.
- Sudhakaran, R., S. Syed Musthaq, P. Haribabu, S.C. Mukherjee, C. Gopal y A.S. Sahul Hameed. 2006. Experimental transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) in three species of marine shrimp (*Penaeus indicus*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus monodon*). *Aquaculture*, 257: 136-141.
- Sudheer, N.S., G. Poullose, A. Thomas, K. Viswanath, A. Kulkarni, R.B. Narayanan, R. Philip y I.S.B. Singh. 2015. Expression profile of bio-defense genes in *Penaeus monodon* gills in response to formalin inactivated white spot syndrome virus vaccine. *Antiviral Research*, 117: 60-68.
- Tang, X., J. Wu, J. Sivaraman y C.L. Hew. 2007. Crystal structures of major envelope proteins VP26 and VP28 from White Spot Syndrome Virus shed light on their evolutionary relationship. *Journal of Virology*, 81: 6709-6717.
- Tattersall, P. 2006. The Evolution of Parvoviruses, en: Kerr, J.R., Cotmore, S.F., Bloom, M.E., Linden, M.R., Parrish, C.R. (Eds.), *Parvoviruses*. Edward Arnold, New York, NY, pp. 5-14.
- Teunissen, E.A., M. De Raad y E. Mastrobattista. 2013. Production and biomedical applications of virus-like particles derived from polyomaviruses. *Journal of Controlled Release*, 172: 305-321.
- Theopold, U., O. Schmidt, K. Söderhäll y M.S. Dushay. 2004. Coagulation in arthropods: Defence, wound closure and healing. *Trends in Immunology*, 25: 289-294.
- Tijssen, P. 1999. Molecular and structural basis of the evolution of parvovirus tropism. *Acta Veterinaria Hungarica*, 47: 379-394.
- Tirasophon, W., Y. Roshorm y S. Panyim. 2005. Silencing of yellow head virus replication in penaeid shrimp cells by dsRNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334: 102-107.
- Tome, L., S. Carpenter, M. Vignuzzi y L. Frangeul. 2018. Dicer-2-dependent generation of viral DNA from defective genomes of RNA viruses modulates antiviral immunity in insects. *Cell Host and Microbe*, 23: 353-365.
- Trettin, K.D., N.K. Sinha, D.M. Eckert, S.E. Apple y B.L. Bass. 2017. Loquacious-PD facilitates *Drosophila* Dicer-2 cleavage through interactions with the helicase domain and dsRNA. *PNAS*, 5: E7939-E7948.
- Tsai, J.-M., H.-C. Wang, J.-H. Leu, A. H.-J. Wang, Y. Zhuang, P. J. Walker, G.-H. Kou y C.-F. Lo. 2006. Identification of the nucleocapsid, tegument, and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. *Journal of Virology*, 80: 3021-3029.

- Tsai J.M., H.C. Wang, J.H. Leu., H.H. Hsiao, A.H.J. Wang, G.H. Kou y Lo C.F. Genomic and proteomic analysis of thirty-nine structural proteins of shrimp white spot syndrome virus. *Journal of Virology* 78:11360–11370.
- Tu, C., H.-T. Huang, S.-H. Chuang, J.-P. Hsu, S.-T. Kuo, N.-J. Li, T.-L. Hsu, M.-C. Li y S.-Y. Lin. 1999. Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms*, 38: 159-161.
- Tuschl, T., P.D. Zamore, R. Lehmann, D.P. Bartel y P.A. Sharp. 1999. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes and Development*, 13: 3191-3197.
- Umbach, J.L. y B.R. Cullen. 2009. The role of RNAi and microRNAs in animal virus replication and antiviral immunity. *Genes and Development*, 23: 1151-1164.
- Underwood, D.J., J.A. Cowley y K.N. Johnson. 2013. Antiviral immunity and protection in penaeid shrimp. *Invertebrate Immunity*, 1: 2-14.
- Vanderschuren, H., A. Alder, P. Zhang y W. Gruissem. 2009. Dose-dependent RNAi-mediated geminivirus resistance in the tropical root crop cassava. *Plant Molecular Biology*, 70: 265-272.
- van Hulten, M.C.W., J. Witteveldt, S. Peters, N. Kloosterboer, R. Tarchini, M. Fiers, H. Sandbrink, R.K. Lankhorst, y J.M. Vlak. 2001. The White Spot Syndrome Virus DNA Genome Sequence. *Virology*, 286: 7-22.
- Vargas-Albores, F. y G. Yepiz-Plascencia. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture*, 191: 13-21.
- Vazquez, L., J. Alpuche, G. Maldonado, C. Agundis, A. Pereyra-Morales y E. Zenteno. 2009. Review: Immunity mechanisms in crustaceans. *Innate Immunity*, 15: 179-188.
- Vega-Heredia, S., F. Mendoza-Cano y A. Sánchez-Paz. 2012. The infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus: a brief review of what we do and do not know. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59: 95-105.
- Verbruggen, B., L.K. Bickley, R. Van Aerle, K.S. Bateman, G.D. Stentiford, E.M. Santos y C.R. Tyler. 2016. Molecular mechanisms of White Spot Syndrome Virus infection and perspectives on treatments. *Viruses*, 8: 1-29.
- Vincent, A.G. y J.M. Lotz. 2005. Time course of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in experimentally infected *Litopenaeus vannamei* and quantification of NHP-bacterium using real-time PCR. *Diseases of Aquatic Organisms*, 67: 163-169.
- Vincent, A.G., V.M. Breland y J.M. Lotz. 2004. Experimental infection of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* with Necrotizing Hepatopancreatitis (NHP) bacterium by per os exposure. *Diseases of Aquatic Organisms*, 61: 227-233.

- Wang, J.M., H.J. Zhang y Z.L. Shi. 2008. Expression and assembly mechanism of the capsid proteins of a satellite virus (XSV) associated with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus. *Virologica Sinica*, 23: 73-77.
- Wang, P.-H., D.-H. Wan, Z.-H. Gu, X.-X. Deng, S.-P. Weng, X.-Q. Yu y J.-G. He. 2011. *Litopenaeus vannamei* tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) responds to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus (WSSV) infection and activates antimicrobial peptide genes. *Developmental and Comparative Immunology*, 35: 105-114.
- Wang, X.-W. y J.-X. Wang. 2013. Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, 39: 27-38.
- Wang, Y., A.S. Gosselin Grenet, I. Castelli, G. Cermenati, M. Ravallec, L. Fiandra, S. Debaisieux, C. Multeau, N. Lautredou, T. Dupressoir, Y. Li, M. Casartelli y M. Ogliastro. 2013. Densovirus crosses the insect midgut by transcytosis and disturbs the epithelial barrier function. *Journal of Virology*, 87: 12380-12391.
- Wang, Y.C., P.S. Chang y H.Y. Chen. 2007. Tissue expressions of nine genes important to immune defence of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 23: 1161-1177.
- Watson, M., M. Sharma, M.G. Sterken, E. Schnettler, H. Tykalov, D.J. Obbard, S.H. Lewis, M. Mcfarlane, L. Bell-sakyi, G. Barry, S. Weisheit, S.M. Best, R.J. Kuhn, G.P. Pijlman, M.E. Chase-topping, E.A. Gould, L. Grubhoffer, J.K. Fazakerley y A. Kohl. 2014. Induction and suppression of tick cell antiviral RNAi responses by tick-borne flaviviruses. *Nucleic Acids Research*, 42: 9436-9446.
- Weber, F., V. Wagner, S.B. Rasmussen, R. Hartmann y S.R. Paludan. 2006. Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *Journal of Virology*, 80: 5059-5064.
- Wilson, R.C. y J.A. Doudna. 2013. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annual Review of Biophysics*, 42: 217-239.
- Wittrup, A. y J. Lieberman. 2015. Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. *Nature Reviews: Genetics*, 16: 543-552.
- Wood, W.I. 1976. Tables for the preparation of ammonium sulfate solutions. *Analytical Biochemistry*, 73: 250-257.
- Xie, J. y R. Xu. 2017. Trends in orally viral vector gene delivery and therapy, en: Andronescu, E., Grumezescu, A. (Eds.), *Nanostructures for Oral Medicine*. Elsevier Inc., pp. 123-146.
- Xie, X., L. Xu, and F. Yang. 2006. Proteomic analysis of the major envelope and nucleocapsid proteins of white spot syndrome virus. *Journal of Virology*, 80: 10615-10623.

- Xie X. y Yang F. 2005. Interaction of white spot syndrome virus VP26 protein with actin, *Virology*, 336:93–99.
- Xu, D., W. Liu, A. Alvarez y T. Huang. 2014. Cellular immune responses against viral pathogens in shrimp. *Developmental and Comparative Immunology*, 47: 287-297.
- Xu, J., F. Han y X. Zhang. 2007. Silencing shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes by siRNA. *Antiviral Research*, 73: 126-131.
- Xue, B., D. Blocquel, J. Habchi, A. V. Uversky, L. Kurgan, V.N. Uversky y S. Longhi. 2014. Structural disorder in viral proteins. *Chemical Reviews*, 114: 6880-6911.
- Yang, G., X. Xiao, D. Yin y X. Zhang. 2012. The interaction between viral protein and host actin facilitates the virus infection to host. *Gene*, 507: 139-45.
- Yang, Z. y Y. Li. 2018. Dissection of RNAi-based antiviral immunity in plants. *Current Opinion in Virology*, 32: 88-99.
- Yi G., Z. Wang, Y. Qi, L. Yao, J. Qian y L. Hu. 2004. VP28 of shrimp white spot syndrome virus is involved in the attachment and penetration into shrimp cells. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 37:726–734.
- Yodmuang, S., W. Tirasophon, Y. Roshorn, W. Chinnirunvong y S. Panyim. 2006. YHV-protease dsRNA inhibits YHV replication in *Penaeus monodon* and prevents mortality. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 341: 351-356.
- Zamore, P.D. 2007. Genomic defence with a slice of pi. *Nature*, 446: 864-865.
- Zamore, P.D., T. Tuschl, P.A. Sharp y D.P. Bartel. 2000. RNAi : Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101: 25-33.
- Zdanowicz, M. y J. Chroboczek. 2016. Virus-like particles as drug delivery vectors. *Acta Biochimica Polonica*, 63: 469-473.
- Zhang, J., F. Li, Z. Wang y J. Xiang. 2007. Cloning and recombinant expression of a crustin-like gene from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Journal of Biotechnology*, 127: 605-614.
- Zhang, X., C. Huang, X. Tang, Y. Zhuang y C.-L. Hew. 2004. Identification of structural proteins from shrimp white spot syndrome virus (WSSV) by 2DE-MS. *Proteins*, 55: 229-235.
- Zhang X.B., C.H. Huang., X. Xu., C.L. Hew. 2002. Transcription and identification of an envelope protein gene (p22) from shrimp white spot syndrome virus. *Journal of General Virology*, 83:471–477.
- Zhou, J. y J.J. Rossi. 2011. Progress in RNAi-Based Antiviral Therapeutics, en: Rij, R.P. Van

(Ed.), *Antiviral RNAi: Concepts, methods, and applications*. *Methods in molecular biology*, vol. 721. Humana Press, Nueva York, pp. 67-75.