

INFORME FINAL

Reducción de la prevalencia del Virus de la Necrosis hipodérmica hematopoyética Infecciosa (IHHNV) en los reproductores de camarón blanco *Penaeus vannamei* de la línea Colombiana usando ARN de interferencia con la finalidad de facilitar su exportación

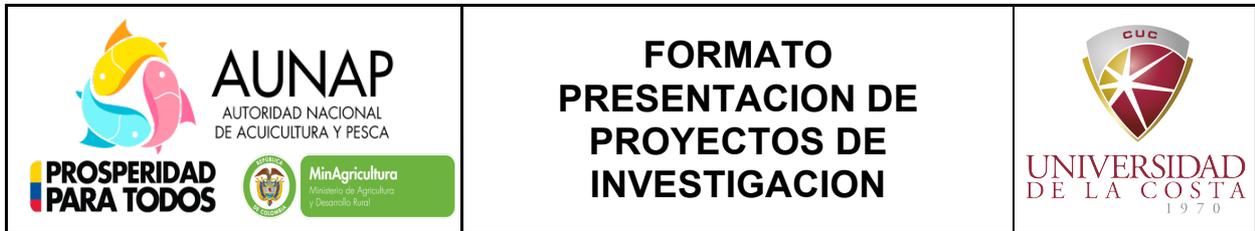
INTRODUCCION

Las enfermedades, especialmente aquellas ocasionadas por patógenos infecciosos, son consideradas como uno de los principales riesgos para el cultivo de camarones peneidos a nivel mundial. La aparición constante de nuevos patógenos y la relación dinámica entre el patógeno, el hospedero y el medio ambiente hacen necesaria una investigación permanente de sanidad en el cultivo del *P. vannamei*. Una de las estrategias para el control de patógenos es la siembra de animales libres de todas aquellas enfermedades que puedan desatar una epidemia durante el cultivo. Esta estrategia, la siembra de animales SPF (libres de patógenos específicos) se ha extendido en los últimos años, y muchos países han adoptado la política de importar únicamente camarones SPFs independiente de las condiciones de cultivo o de la prevalencia de patógenos en los estanques (Lightner 1996). Los animales del programa de mejoramiento genético de CENIACUA son libres de todos los patógenos de notificación obligatoria para la OIE, con la excepción del Virus de la Necrosis hipodérmica hematopoyética Infecciosa (IHHNV). En la actualidad la presencia de IHHNV, limita la posibilidad de exportar la semilla Colombiana, a pesar de los numerosos estudios realizados por CENIACUA donde se comprueba que no existe ningún impacto de la infección por IHHNV en las poblaciones del programa de mejoramiento genético (Pulgarin et al., en preparación). Inclusive hay dos estudios donde se demuestra que la presencia de IHHNV confiere una protección frente a infecciones por virus letales como es el caso del virus de la Mancha Blanca (WSSV) (Tang et al 2003; Bonnichon et al 2006).

El virus IHHNV, uno de los primeros virus descritos en cultivos de camarones peneidos, se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial tanto en las áreas de cultivo como en el camarón silvestre (Nunan et al., 2000; Tang and Lightner, 2002). IHHNV es un virus de DNA de cadena sencilla de aproximadamente 4.1kb. El virión no tiene envoltura y tiene un tamaño de 20-22 nm. El genoma tiene 3 marcos de lectura abiertos: ORF1 codifica para las proteínas no estructurales, ORF2 tiene una función desconocida y ORF3 codifica para las proteínas de la cápside (Bonami et al., 1990) El IHHNV tiene una amplia distribución tanto en las poblaciones silvestres como en los cultivos de camarones peneidos en América, Asia y Oceanía (Lightner 1996).

La prevalencia de IHHNV en los camarones del programa de mejoramiento genético (sin causar enfermedad alguna) ha dificultado su comercialización en los países en los cuales solo se permite la importación de camarones SPFs. En países como Guatemala, India y Arabia Saudita entre otros, que han mostrado gran interés por la semilla de camarón colombiano por sus buenos crecimientos y su resistencia al TSV, no ha sido posible enviar el material genético desarrollado debido a la presencia de IHHNV en las poblaciones de camarones. Esta desventaja competitiva ha sido aprovechada por otros grupos de mejoramiento genético con menos trayectoria que la de CENIACUA que sin embargo poseen camarones SPF lo cual les ha permitido ingresar fácilmente a dichos mercados.

Recientemente investigadores a nivel mundial han encaminado sus esfuerzos a la prevención de enfermedades virales a través del uso de la biología molecular. Recientemente ha aparecido una nueva técnica denominada ARN de interferencia el cual es un mecanismo celular que existe en organismos eucariotas y que puede ser activado por una



doble hebra de ARN (dsARN) específica para la destrucción de patógenos incluyendo virus (Fire 1999, Fire et al., 1998). Inicialmente la ds ARN insertada es cortada por la enzima Dicer en varias cadenas cortas de alrededor de 20 nucleótidos denominadas siRNA (small-interfering RNA). Estas pequeñas cadenas se desenhebran y una de ellas (la hebra 'antisentido') se ensambla en un complejo proteico denominado RISC (RNA-induced silencing complex), que utiliza la hebra de siRNA como guía para identificar el ARN mensajero complementario. El complejo RISC cataliza clivaje del ARNm complementario a través de la proteína argonauta, bloqueando así la expresión del gen a nivel post-transcripcional (Fire 1999). En camarones, esta metodología se ha empezado a utilizar a nivel experimental para eliminar algunos virus del camarón como el virus de la Mancha blanca (WSSV), Virus de la Cabeza Amarilla (YHV) (Robalino et al., 2005) e IHHNV (Ho et al., 2011). Para eso se están empleando secuencias específicas del genoma viral involucradas en la replicación de tal manera que cuando se encuentran las cadenas de ARN complementarias a las secuencias específicas del virus, el mecanismo de ARN de interferencia las destruirá inhibiendo de esta manera su replicación. A nivel comercial se ha especulado que este mecanismo se podría usar, sin embargo no hay ningún estudio al respecto. Este proyecto busca eliminar el virus IHHNV de los camarones del programa de mejoramiento genético a usando ARN de interferencia para mejorar la competitividad y facilitar el acceso a mercados internacionales a los cuales no se ha podido ingresar debido a la presencia de este patógeno en la población.

OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO

Facilitar la exportación de línea Colombiana de *Penaeus vannamei* al eliminar el Virus de la Necrosis hipodérmica hematopoyética infecciosa (IHHNV) usando ARN de interferencia.

OBJETIVOS ESPECIFICOS DEL PROYECTO

1. Determinar la prevalencia de IHHNV en los reproductores del lote actual programa de mejoramiento genético
2. Seleccionar diferentes genes en el genoma de IHHNV y producir *in vitro* hebras dobles de ARN (dsARN) de estos genes
3. Determinar la eficacia de la introducción de los diferentes dsARN en la eliminación del virus en camarones portadores de IHHNV

METODOLOGIA

1. Determinar la prevalencia de IHHNV en los reproductores del lote actual programa de mejoramiento genético

Muestreo

El lote 29-30 del programa de mejoramiento genético constó de alrededor de 4000 reproductores de *P. vannamei*. Con una jeringa de insulina se tomaron muestras no letales de alrededor de 100 μ l de hemolinfa por camarón, e inmediatamente se colocaron en micro tubos de 1.5 mL con etanol analítico al 95%, donde se mantuvieron refrigerados hasta el análisis de IHHNV por PCR (Figura 1).



Figura 1. Toma de muestra de hemolinfa en los senos lagunares ventrales de reproductor macho.

Se tomaron muestras de todos los machos del programa de mejoramiento genético del lote 29 y 30, y de todas las hembras que participaron en los cruces. Durante la transferencia de los tanques de cría a los tanques de maduración se colectaron las muestras de hemolinfa de todos los camarones como se describió anteriormente..

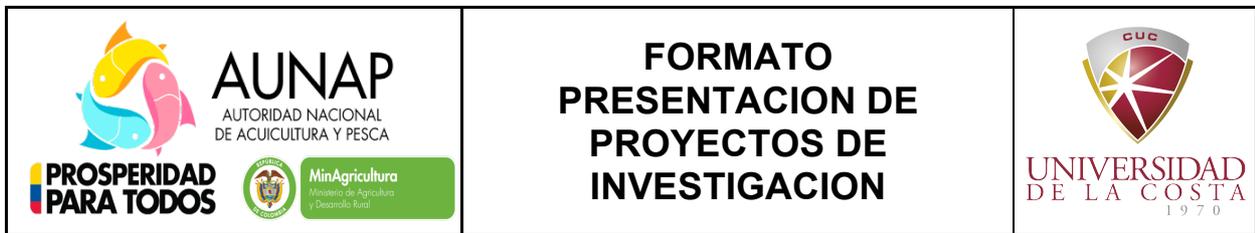


Figura 2. Material de muestreo en el laboratorio de maduración. Se observa los microtubos eppendorf llenos de etanol al 95% previamente marcados.



Figura 3. Muestreo de camarones del programa de mejoramiento genético del lote 29 y lote 30

Con los reproductores del lote 29 y el lote 30, usando inseminación artificial se produjeron las familias del lote 32. Durante la fase de larvicultura se tomaron 10 postarvas (PLs) de cada familia (98 familias en esta etapa) y se realizó un



pool por familia para análisis de IHHNV por PCR. A nivel de crecimiento a 1 g (70 familias), 10 pleópodos de camarones juveniles fueron tomados y se realizo un pool por familia para análisis de IHHNV por PCR.

Extracción de ADN y Análisis de PCR

Para obtener ADN a partir de las muestras de hemolinfa preservadas en etanol al 95%, se utilizo el sistema de columnas de silica SV Wizard de promega. Para amplificar el ADN especifico a través de la PCR se uso el sistema Go Taq Hot start Green Master Mix (Promega). 9.5 µl de Master mix 2X, 0.8 µl de iniciadores (F y R), 7.2 µl agua desionizada y 1.5 µl de ADN extraído.

El primer paso fue determinar la integridad del ADN extraído a partir de la hemolinfa usando un control interno. Para esto se amplificaron todas las muestras con los iniciadores para el gen 18S ARN ribosomal de decápodos (Dec F: 5'TGC CTT ATC AGC TNT CGA TTG TAG 3' y Dec R: 5'TTC AGN TTT GCA ACC ATA CTT CCC3') que generan un fragmento de 840 pb. Un resultado positivo indica que el ADN es de buena calidad y que no hay inhibidores en la muestra. Para la amplificación del gen de decápodo se usaron los siguientes iniciadores: EL perfil de la PCR fue de un ciclo de 95°C por 5 minutos seguido por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto y una extensión final de 72°C por 7 minutos y conservación a 4°C. Solamente las muestras positivas en esta PCR se usaron para determinar la presencia de IHHNV.

Para la amplificación del IHHNV, se usaron los iniciadores descritos por la OIE (2012) que amplifican el ORF 1 (gen no estructural) de 389 pb. 389F: 5'-CGG-AAC-ACA-ACC-CGA-CTT-TA-3'. 389 R5'-GGC-CAA-GAC-CAA-AAT-ACG-AA-3'. EL perfil de la PCR fue de un ciclo de 95°C por 5 minutos seguido por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto y una extensión final de 72°C por 7 minutos y conservación a 4°C

Posteriormente estandarizamos una reacción de multiplex usando los dos juegos de iniciadores (control interno e IHHNV) en la misma reacción de PCR. con una concentración final de 0.2 pmoles para cada iniciador en la reacción de PCR.

2. Seleccionar diferentes genes en el genoma de IHHNV y producir *in vitro* hebras dobles de ARN (dsARN) de estos genes

Se seleccionaron 2 regiones del genoma de IHHNV para producir las ds ARN. La primera región corresponde al ORF1 (Marco de lectura abierto, por sus siglas en ingles) del IHHNV que codifica a proteínas no estructurales y la segunda región corresponde al ORF 3 que codifica para la cápside del virus. Se diseñaron los iniciadores usando el software snap Dragon (<http://www.flymai.org/snapdragon>) especializado para producir ARN de doble cadena. Una vez se diseñaron los iniciadores, se les agrego al extremo 5' de cada iniciador (Forward y Reverse) la secuencia T7 del promotor de la ARN polimerasa. El ADN de animales que dieron positivo para IHHNV fueron amplificados con estos iniciadores en una reacción de PCR usando el mismo perfil de amplificación descrito anteriormente. El producto amplificado resultante se limpio con el kit de Qiagen PCR clean. Este kit remueve los oligonucleótidos libres. El producto amplificado y limpio se transcribió usando dos sistemas: el sistema de Life Technologies MEGAscript T7 kit y el sistema de Ribomax (Promega) para generar dsRNA. Las muestras transcritas fueron limpiadas y cuantificadas en espectrofotometría. Igualmente 1 µl del producto transcrito de ARN fue evaluado en gel de electroforesis para determinar su integridad.

3. Determinar la eficacia de la introducción de los diferentes dsARN en la eliminación del virus en camarones portadores de IHHNV.

Los reproductores analizados del programa de mejoramiento genético se marcaron individualmente con códigos oculares. Luego se analizaron para IHHNV por PCR y se seleccionaron aquellos que dieron resultados positivos en esta reacción para ser inyectados con los diferentes transcritos de las dos regiones del IHHNV (ORF 1 y ORF 3). En la

figura de abajo se presenta el modulo experimental usado para este bioensayo. Para el ensayo inicial se dispusieron 4 tanques. En cada uno se realizo un tratamiento especifico



Figura 4. Muestreo al inicio del ensayo. toma de hemolinfa para confirmar la presencia de IHNV en los reproductores usados para esta prueba



Figura 5. Tanques de 1 ton usados para el bioensayo

Figura 6. Tanques llenos de agua de mar con reproductores de *Penaeus vannamei*



Figura 7. Pesca de reproductores para inyeccion de ds ARN

Figura 8. Mantenimiento de reproductores antes de la inyección



Figura 9. Inyección intramuscular de 100 µl de solución con 3 µg de dsARN de los genes del ORF 1 y ORF 3 de dsARN



Figura 10. Posición de la inyección intramuscular de dsARN en el segundo segmento abdominal

La distribución de los animales en los 4 tanques la siguiente:

Tanque	Tratamiento	Tamaño del dsARN	Gen	Dosis
1	ORF 3 (RNA i)	400 pb	Cápside	3 µg/ camarón de 35 g
2	ORF 1 (NS)	471 bp	Gen no estructural.	3 µg/ camarón de 35 g
3	Control positivo. ARN inespecífico	500 pb	Factor 1 alpha de elongación de Xenopus	3 µg/ camarón de 35 g
4	Control negativo	Agua usp		100 ul de agua

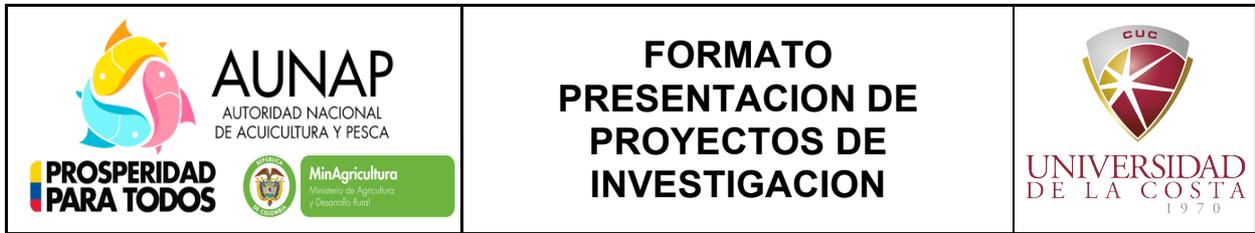
Los camarones fueron observados y alimentados dos veces por día (AM y PM). semanalmente y durante un mes se tomaron muestras no letales de hemolinfa y se analizaron para IHHNV siguiendo la metodología descrita anteriormente. Se evaluó la mortalidad en cada uno de los casos.

Posteriormente se realizó otra prueba similar a la anterior, aquí la diferencia radica en la concentración de dsARN que se utilizó para inyectar a los camarones. En la tabla de abajo se presenta el diseño experimental de la segunda prueba

Tanque	Tratamiento	Tamaño del dsARN	Gen	Dosis
1	ORF 3 (RNA i)	400 pb	Capside	135 µg/ camarón de 45 g
2	ORF 1 (NS)	471 bp	Gen no estructural.	135 µg/ camarón de 45 g
3	Control positivo. ARN inespecífico	1890 pb	Factor 1 alpha de elongación de Xenopus	135 µg/ camarón de 45 g
4	Control negativo	Agua usp		100 ul de agua

4. Amplificación del genoma de IHHNV

Para confirmar que fragmento(s) del genoma del IHHNV se encontraba en las muestras o si por el contrario se podría tratar de una inserción, se diseñaron iniciadores dirigidos a las diferentes regiones del genoma del IHHNV. La secuencia genómica incluye los tres marcos abiertos de lectura (Open Reading Frame, ORF) los cuales han sido reportados con un bajo nivel de variación (Tang & Lightner 2002). A partir de la secuencia reportada en el Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI) se seleccionaron todos los fragmentos con el fin de diseñar iniciadores que amplificaran todo el genoma del virus de IHHNV (GenBank AF218266).



FORMATO PRESENTACION DE PROYECTOS DE INVESTIGACION

Región genoma (posición nucleótidos)	Secuencia de iniciadores	Tm(°C)
7-F	5'-GCG AAG CGC GAG TAT CCA TC-3'	62.5
694-R	5'-TGA TTC TGG TCC GCC TGA C-3'	60.5
679-F	5'-GGG CGA ACC AGA ATC ACT TA-3'	54.8
1070-R	5'-ATC CGG AGG AAT CTG ATG TG-3'	54.1
1006-F	5'-TGA CAG GGG TAA AAA GAG ACA GAG-3'	56.2
1299-R	5'-AGT CGC CTT CCG TCC ATT TC-3'	57.5
1523-F	5'-GAA GCT GAA GCG ACT ACG GT-3'	60.5
2177-R	5'-GGC CAG TGT TCA GTT TTC CG-3'	60.5
2144-F	5'-ATC GGT GCA CTA CTC GGA-3'	55.6
2499-R	5'-TCG TAC TGG CTG TTC ATC-3'	51.7
2419-F	5'-AGC TCT ACA AAC AAG AAC AAA AAC C-3'	54.3
3298-R	5'-CAT TTT GGG ATG AAG GTG GGT C-3'	56.2
3195-F	5'-CAA ATG CGA ACC GGT GAC AG-3'	57
3546-R	5'-GTC CAG TAC ATG GTG CGT GA-3'	57.2
3510-F	5'-GGG ATG TTA CAA TAT CTT CAC GCA-3'	55.1
3909-R	5'-CTT CGC AGA AAC CGT TAA CTT AATA-3'	53.5

Se utilizaron muestras de ADN que tenían resultados positivos por PCR para IHHNV con los iniciadores descritos por la OIE (2012) que amplifican el ORF 1 (gen no estructural). Las secuencias de los iniciadores utilizadas fueron 389F: 5'-CGG-AAC-ACA-ACC-CGA-CTT-TA-3'. 389 R5'-GGC-CAA-GAC-CAA-AAT-ACG-AA-3'. La extracción de ADN y la PCR se realizó siguiendo los mismos procedimientos descritos anteriormente.

Con el fin de determinar la temperatura ideal para la amplificación, se realizó un gradiente de temperatura entre 50-60°C con el siguiente programa de amplificación utilizando el termociclador digital Axygen Maxygen (Gradient thermal cycler).

Programa:

TERMOCICLADOR	TEMPERATURA
Ciclo inicial de Denaturación	95°C por 5 minutos
35 ciclos de: Denaturación	95°C por 30 segundos
Anillaje	50-60°C por 30 segundos
Extensión	72°C por 1 minutos
Extensión final	72°C por 7 minutos
Conservación	4°C

5. Hibridación In situ para IHHNV

Para determinar la presencia de IHHNV en los tejidos de camarón, a partir de secciones longitudinales de camarón en laminas de histología cargadas positivamente, se realizaron pruebas de hibridación *in situ*. Para esto se uso una sonda marcada con digoxigenina usando el kit Roche (Diagnostic Corporation). El protocolo se llevo a cabo siguiendo la metodología de Mari et al., (1993).

RESULTADOS

1. Determinar la prevalencia de IHHNV en los reproductores del lote actual programa de mejoramiento genético

Para la determinación de la prevalencia, solo se tuvieron en cuenta los animales en los cuales el control interno amplificó demostrándose así la integridad del ADN de 500 individuos. En la figura de abajo se observan 20 muestras a las cuales se les corrió el control interno y el IHHNV.

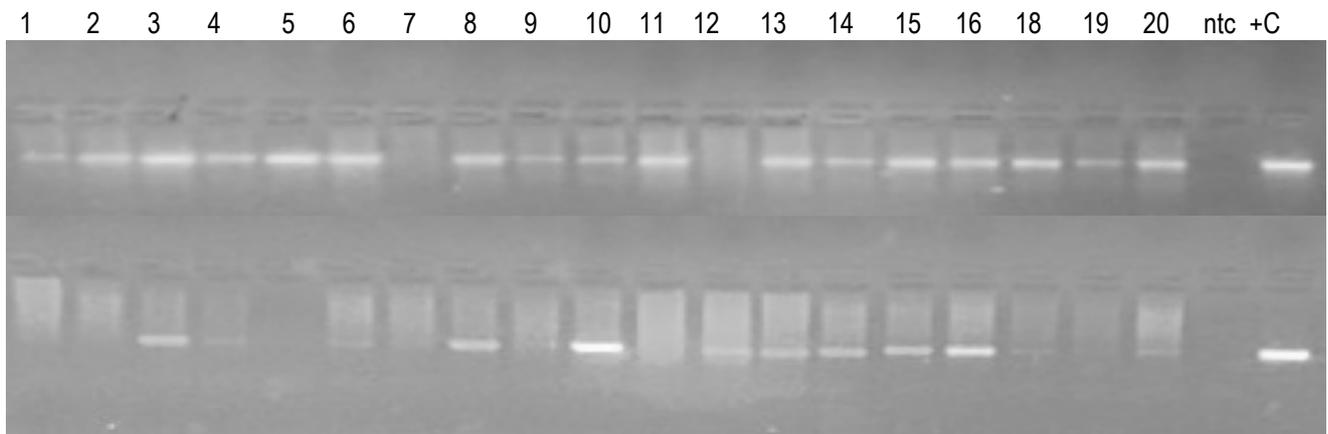


Figura 11. Ejemplo de uno de los geles que se corrieron para determinar la presencia de IHHNV. En el gel superior se observan los resultados del control interno (fragmento de 840 pb), mientras que en la parte inferior se observan las muestras amplificadas con los iniciadores específicos para IHHNV (fragmento de 389 pb).

En el ejemplo anterior se observa que la mayoría de las muestras se les logró amplificar el gen 18S ARN ribosomal de decápodo, indicando que la integridad del ADN era aceptable para detectar IHHNV. Las muestras 7 y 12 no amplificó su control interno, sin embargo en la muestra 12 aunque no amplificó el control interno presentó una banda débil de IHHNV. Las muestras 10 y 16 presentaron un resultado positivo (+++) para IHHNV, mientras que en las muestras 3, 4, 8, 12, 13, 14, 15, 18 y 20 presentaron un resultado positivo débil (+). Todas las muestras para este proyecto fueron analizadas de igual forma.

La prevalencia de IHHNV de los reproductores **machos** del programa de mejoramiento genético del lote 29 y 30 se presenta en la siguiente tabla.

Machos	Lote 29	%	Lote 30	%	Total	%
Positivo	24	22%	25	10.8%	49	14.4%
Negativo	85	78%	206	89.2%	291	85.6%
Total	109	100%	231	100%	340	100%

La prevalencia de IHHNV de los reproductores **hembras** del programa de mejoramiento genético del lote 29 y 30 se presenta en la tabla 2.

Hembras	Lote 29	%	Lote 30	%	Total	%
Positivo	1	33%	38	24.5%	39	24.6%
Negativo	2	67%	117	75.4%	119	75.4%
Total	3	100%	155	100%	158	100%

En total se analizaron 498 camarones que fueron aquellos que presentaron control interno positivo. De este número 340 fueron machos y 158 hembras. La prevalencia general de los reproductores del lote 29-30 fue del 17.6%. La prevalencia de IHHNV fue más baja en los machos que en las hembras ($P < 0.0001$). Al comparar el lote 29 con el lote 30, la prevalencia de IHHNV fue más alta en los machos del lote 29 que en el lote 30 ($P < 0.05$). No se pudo hacer esa comparación con las hembras debido a que el número de representantes del lote 29 fue muy bajo.

Al mirar la relación de camarones positivos para IHHNV y la familia a la que corresponde, se encontró que de las 55 familias de las cuales se contó con representantes para hacer análisis de IHHNV, se presentó IHHNV en el 59% de estas.

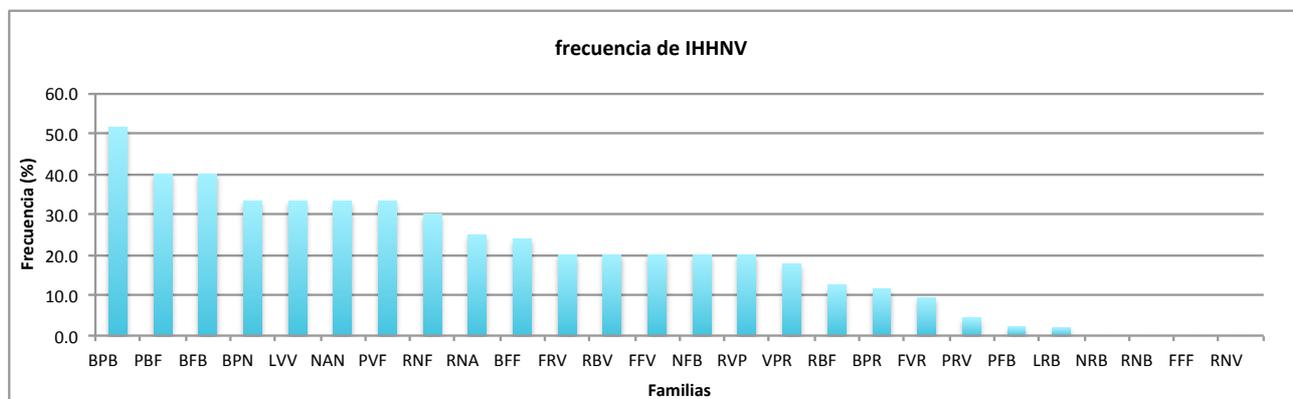


figura 12. Frecuencia de IHHNV en las 55 familias de los lotes 29 y 30 analizados. Solamente se tuvieron en cuenta 26 familias con $N > 4$

Estos resultados podrían indicar que en algunas familias en las que se tomaron muestras representativas, la prevalencia de IHHNV fue 0%. Esto podría sugerir que hay un componente genético de resistencia en algunas familias. Así mismo estos resultados pueden indicar que el fragmento de ADN que corresponde al IHHNV no está presente en dichas familias.

Para la generación del siguiente lote (lote 32), solamente se usaron reproductores que presentaron resultados negativos para IHHNV. Se consideraron negativas aquellas muestras que después de la amplificación de PCR no presentaron en el gel ninguna banda, o en donde se presentó una banda débil. Todos los reproductores machos y hembras en donde se presentó una banda fuerte en el gel PCR, fueron descartados.

Las larvas producidas por las diferentes familias fueron analizadas por PCR en estadio de lote PL 10. En la tabla de abajo se presentan los resultados de PCR para IHHNV del lote 32 en estadio de PL 10.

Larvicultura	Lote 29	%	Lote 30	%	Total	%
Positivo	3	17.6%	14	17.2 %	17	17.3
Negativo	14	82.4%	67	82.7%	81	82.7%
Total	17	100%	81	100%	98	100%

La prevalencia de IHHNV en la larvicultura del lote 32 fue de 17%. Estas familias fueron llevadas a tanques individuales donde estas alcanzaron un gramo. En esta fase se tomaron nuevamente muestras de las 70 familias que llegaron hasta esta fase. Los resultados de PCR para IHHNV se presentan en la siguiente tabla

Crecimiento a 1 g	Lote 29	%	Lote 30	%	Total	%
Positivo	0		0		0	0%
Negativo	13		57		70	100%
Total	13		57		70	100%

La prevalencia de IHHNV en crecimiento a 1 g fue de 0%. Algunas muestras presentaron algunas bandas débiles que se consideraron negativas.

Con la finalidad de optimizar los reactivos se decidió estandarizar una PCR dúplex con el fin de detectar tanto el gen del control interno como el virus del IHHNV en una sola prueba. Los resultados se presentan a continuación:

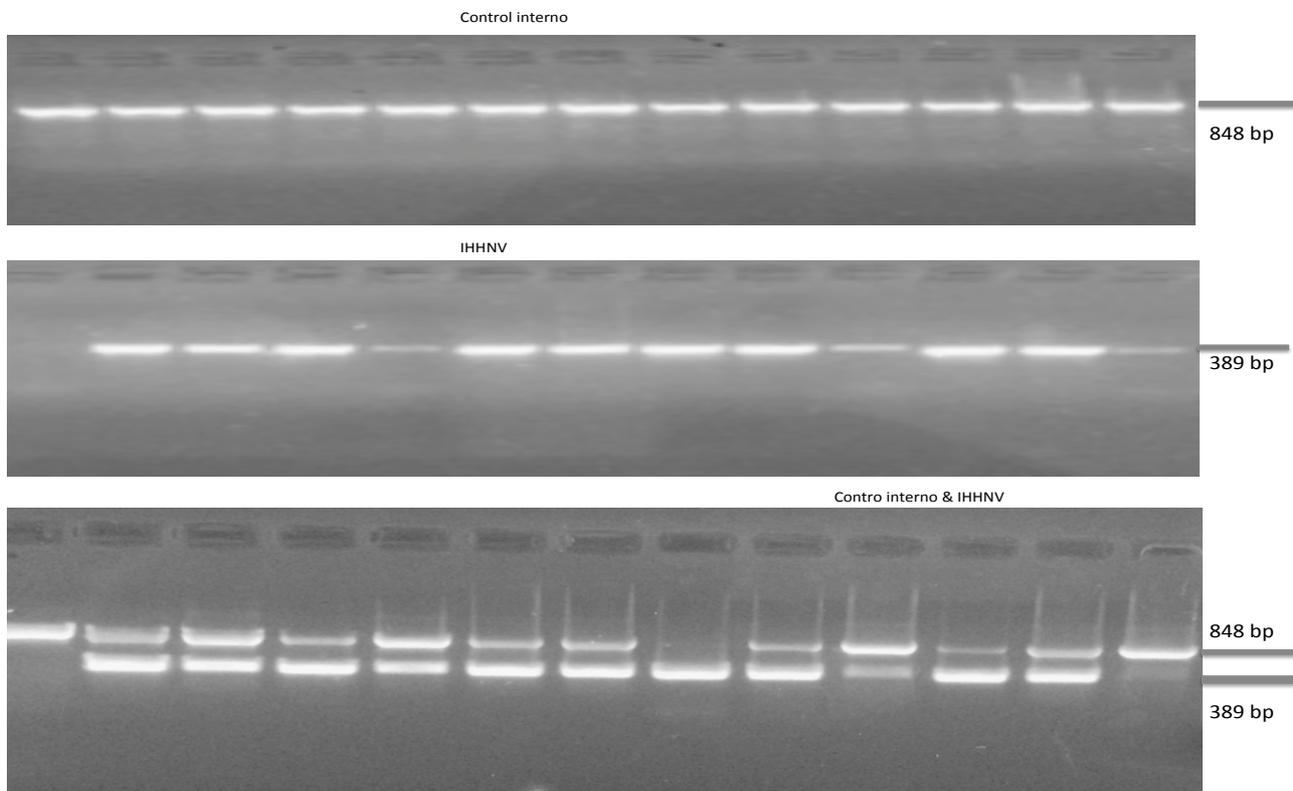
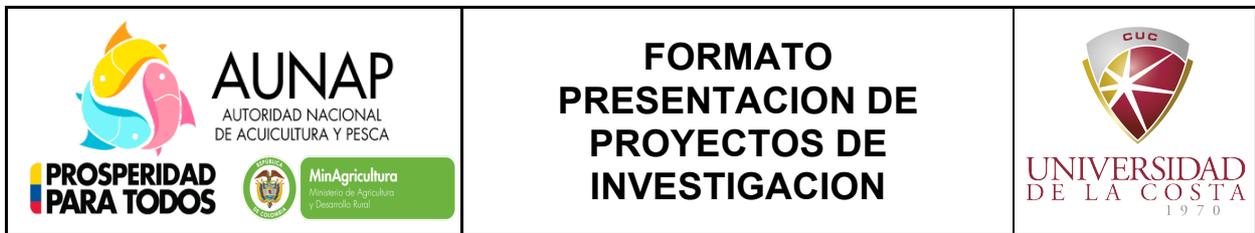


Figura 13. PCR dúplex para IHHNV



En la Figura 13 se observó que todas las muestras presentaron el control interno indicando la integridad del ácido nucleico. En la siguiente gel se observa los resultados de IHHNV de las mismas muestras de arriba. En la gel de abajo se observan dos bandas en algunas muestras. La banda superior corresponde a la amplificación del control interno y la banda de abajo corresponde a la de IHHNV. Estos resultados indican que se pueden hacer las dos PCR en una sola reacción.

2. Seleccionar diferentes genes en el genoma de IHHNV y producir *in vitro* hebras dobles de ARN (dsARN) de estos genes

Con base en el genoma del IHHNV se usaron 2 marcos de lectura abierto (ORF) para seleccionar 2 genes que pudiesen ser suprimidos total o parcialmente (knockout o knockdown) con lo cual el virus no pudiese replicar. A continuación se presenta la descripción del mapa del genoma del IHHNV

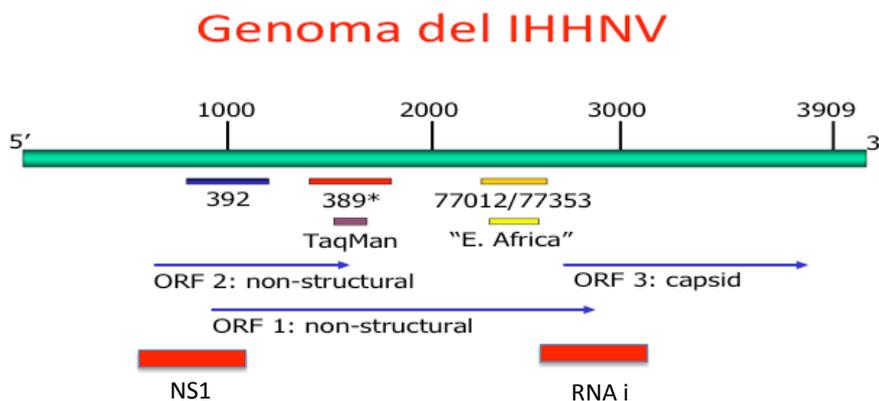


Figura 14. Descripción de los marcos de lectura abierto del IHHNV

Se seleccionaron dos regiones del IHHNV que corresponden a 2 ORF: el ORF 1 y el ORF 3, los cuales codifican para la polimerasa y para la cápside. En la figura 14 se observa en color rojo las dos regiones seleccionadas para producir el ds ARN. Estos dos genes son importantes en la replicación viral. El ORF 1 que codifica para la polimerasa, es crítica para la replicación. El ORF 3 es indispensable en la adhesión a las células receptoras del hospedero y permite su infección. Se desarrollaron iniciadores para cada uno de estos dos genes. En el extremo 5' de cada iniciador se adicionó el promotor específico T7 el cual es necesario para la transcripción de ADN a ARN. Las letras subrayadas corresponden a la secuencia T7 adicionada a los iniciadores.

ORF 1: NS1 F: 5' GAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGA GA GTG TCA ACA CTG TCA TCC CG
 NS1R: 5' GAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGA GA TCA TCT GAT CCG GAG GAA T

Estos iniciadores amplifican un fragmento de 471 bp desde la posición 607 a 1077.

ORF 3 RNAi IHHNV F 5' GAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGA GA GAG CAA GCC CAA GG AAAA 3'
 RNAi IHHNV R: 5' GAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGA GA GTC TCA AAT GAT GTG CCT CCT 3'

Estos iniciadores amplifican un fragmento de 400 bp desde la posición 2611 a 3010.

Después de un proceso de estandarización usando gradiente de PCR se logró amplificar muestras control de IHNV que han presentado amplificación usando los iniciadores de rutina (iniciadores 389). El perfil de la PCR fue de un ciclo de 94°C por 2 minutos seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos, 72°C por 30 sec y una extensión final de 72°C por 4 minutos y conservación a 4°C

En la figura 15 se observa los resultados de la PCR en dos muestras (14-39 y 14-40) amplificadas con los dos juegos de iniciadores.

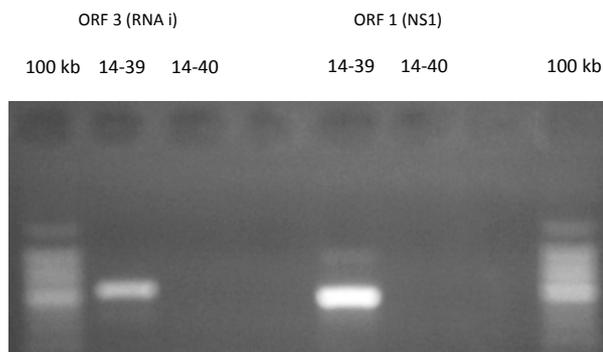


Figura 15. Electroforesis de las muestras amplificadas con los iniciadores ORF 1 y ORF 3.

Se observó amplificación con ambos sets de iniciadores, siendo una banda más intensa la observada con el amplicón del ORF 1. No se observó amplificación con la muestra 14-40.

Posteriormente se limpió el amplicón con el kit de Qiagen y se transcribió para producir doble cadena de ARN de estas dos regiones. Para esto se usó el sistema de transcripción de Ambion T7®. Luego las muestras fueron leídas y cuantificadas por espectrofotometría

Tabla 2. Resultados de la cuantificación de ARN por espectrofotometría en muestras transcritas con Ambion T7®

ORF	A260	A280	ng/ul	A260/A280
ORF 3	0.1139	0.0605	911.2	1.88
ORF 1	0.1633	0.0834	1306.4	1.96
Control	0.1141	0.0634	912.8	1.80

Se corrieron geles con 1 ul del transcrito obtenido y se obtuvieron las siguientes bandas

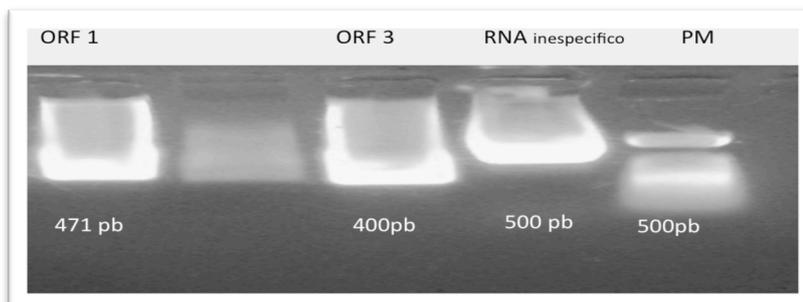
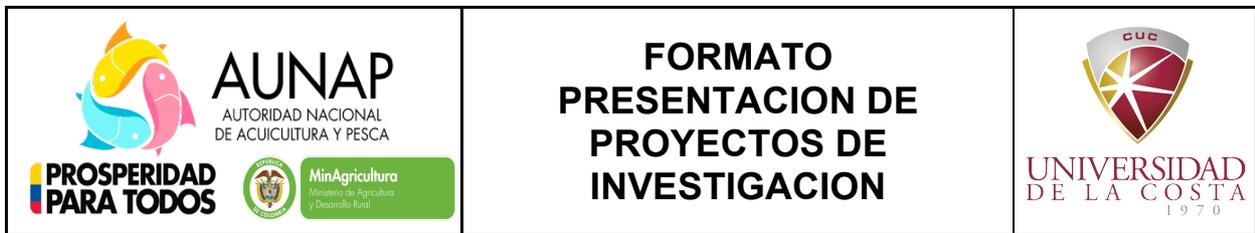


Figura 16. Electroforesis del transcrito



Este proceso se realizo multiples ocasiones con la finalidad de obtener los volúmenes necesarios para la producción de ds ARN suficiente para inyectar a los camarones reproductores.

3. Determinar la eficacia de la introducción de los diferentes dsARN en la eliminación del virus en camarones portadores de IHHNV.

El primer paso fue limpiar el producto transcrito de la secuencia de ds ARN para eliminar los nucleótidos que sobraron de la transcripción y algunas impurezas. Para esto se uso el kit de extracción de ARN de Qiagen® que adicionalmente al proceso de extracción se puede usar para limpiar el transcrito. Para esto se siguieron los protocolos del kit de Qiagen. El transcrito se congelo a -80°C y el proceso de producción de transcrito se repitió en múltiples ocasiones con la finalidad de alcanzar las concentraciones y los volúmenes requeridos.

En la primera prueba se uso 3 ug de ds ARN por camarón. Los resultados de la infección experimental se muestran a continuación.

Tanque	N total	test	IHHNV status inicial	DIA 7 IHHNV (+)	DIA 14 IHHNV (+)	DIA 21 IHHNV (+)	DIA 28 IHHNV (+)
1	4	RNA I (ORF 3)	100%	75%	100%	50%	50%
2	4	NS (ORF 1)	100%	50%	100%	100%	100%
3	4	RNA inespecifico	100%	75%	75%	100%	100%
4	4	Agua	100%	100%	100%	100%	100%

Los camarones inyectados en el día 0 fueron analizados los días 7, 14, 21, y 28 a través de un muestreo no letal de hemolinfa para análisis de PCR. Al final del estudio en el día 28 se logro determinar que no se logró eliminar el IHHNV de los camarones inyectados con el RNA i específicos para IHHNV en la dosis de 3 µg/camarón. Sin embargo se observo una leve reducción en el tanque tratado con ds RNA específico para la capsida (ORF 3). Tampoco se observó reducción de la prevalencia de IHHNV en los animales tratados con ds ARN para el gen no estructural (ORF 1).

En el siguiente experimento, se decidió incrementar la dosis del DS ARN. En esta ocasión se utilizo la dosis de 135 µg de ds ARN por camarón en un volumen de 100 µl. (3 ug/g de camarón)

Tanque	N total	test	Status inicial IHHNV (+)	DIA 2 IHHNV (+)	DIA 10 IHHNV (+)	DIA 20 IHHNV (+)	DIA 30 IHHNV (+)
1	4	RNA I (ORF 3)	100%	100%	50%	25%	50%
2	4	NS (ORF 1)	100%	100%	50%	100%	50%
4	4	Agua	100%	100%	100%	100%	100%

Los resultados de la prueba de la inyección experimental con la ds ARN muestran que aunque hay una reducción de IHHNV, esta reducción no es completa y animales desafiados experimentalmente con ds de ARN continuaban siendo positivos para este virus.

4. Amplificación del genoma de IHHNV

Con base en estos resultados anteriores la siguiente pregunta era establecer si el genoma del IHHNV se encontraba presente en la muestra o solamente se presentaba una inserción de algún fragmento del virus IHHNV. Estas inserciones ya han sido reportadas en algunas poblaciones de camarones *Penaeus monodon* y *Penaeus vannamei*.

El primer paso fue estandarizar la PCR para cada uno de los iniciadores y lograr amplificar las regiones específicas. Los resultados de las pruebas con diferentes temperaturas de anillaje se presentan a continuación:

Iniciadores	Temperatura de alineación °C		
	55	57	60
7-F-694-R	P	D	N
679-F-1070-R	P	D	N
1006-F-1299-R	D	P	D
1523-F-2177-R	P	D	D
2144-F-2499-R	P	D	D
2419-F-3298-R	P	N	N
3195-F-3546-R	P	D	N
3510-F-3909-R	P	D	D

P. Positivo, D positivo débil, N no detectable

Como se observa en la tabla anterior la temperatura óptima para la alineación de los iniciadores fue de 55°C a excepción de los iniciadores dirigidos a la región 1006 1299 con temperatura óptima de alineación óptima de 57°C

En la figura 17 se presentan las muestras amplificadas con estos iniciadores

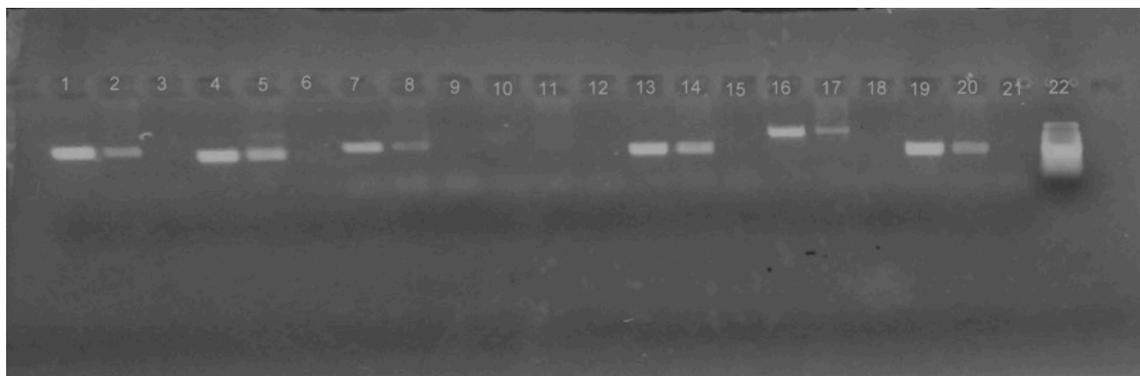
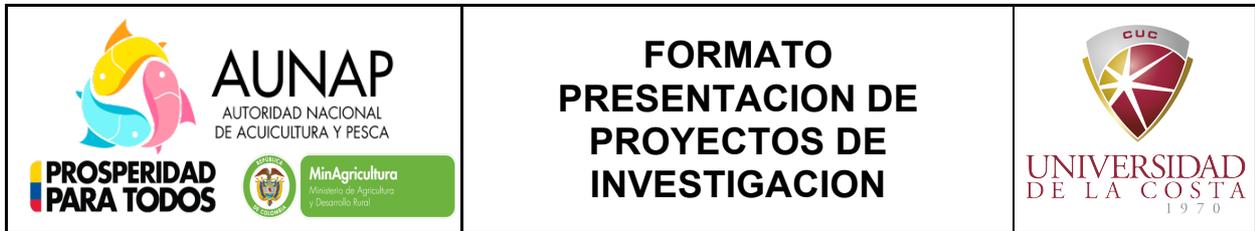


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, de productos amplificados de dos muestras en diferentes regiones del genoma de IHNV

Iniciadores	Longitud del fragmento pb	Línea en el gel
679-F-1070-R	390	1-2
1006-F-1299-R	294	4-5
2144-F-2499-R	356	13-14
2419-F-3298-R	879	15-17
3510-F-3909-R	399	19-20



En el gel de la figura 17 se puede observar los resultados de la amplificación de gran parte del genoma del IHNV lo que sugiere que es posible que la totalidad del genoma este presente en las muestras.

El paso siguiente fue determinar si el hecho de que el genoma de IHNV estaba presente en las muestras, este se podría confirmar en tejidos de camarones positivos. Los análisis histológicos que se realizaron a todos los camarones del lote 29, 30 y a los reproductores usados para las pruebas de RNA i, no mostraron los típicos cuerpos de inclusión intranuclear tipo Cowdry tipo A, lo cual sugería que el virus no estaba causando ningún efecto citopático en los tejidos del camarón. Para confirmar si el virus podría encontrarse en algunos tejidos sin producir lesiones, se decidió realizar pruebas de hibridación *in situ* con sondas específicas para IHNV.

5. Hibridación *In situ* para IHNV

A partir de cortes histológicos de camarones que presentaron resultados de PCR positivos para IHNV, se hicieron pruebas de hibridación *in situ* (ISH) para IHNV usando los protocolos descritos en la metodología.

En las figuras 18-20 se observan las laminas de animales positivos para IHNV por PCR a las cuales se les corrió la ISH

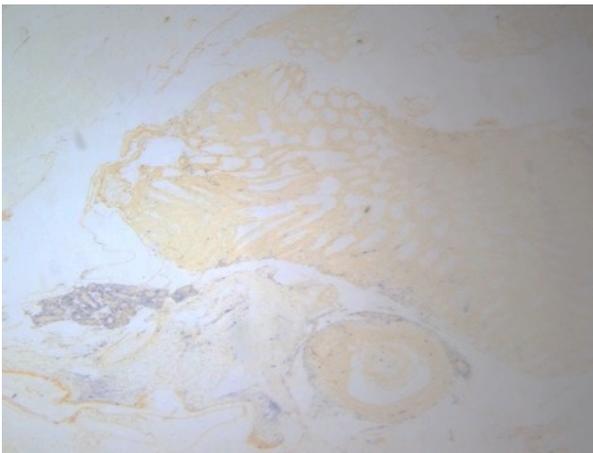


Figura 18 A. Corte longitudinal de camaron control (+) despues del proceso de hibridacion In situ para IHNV (40 X)

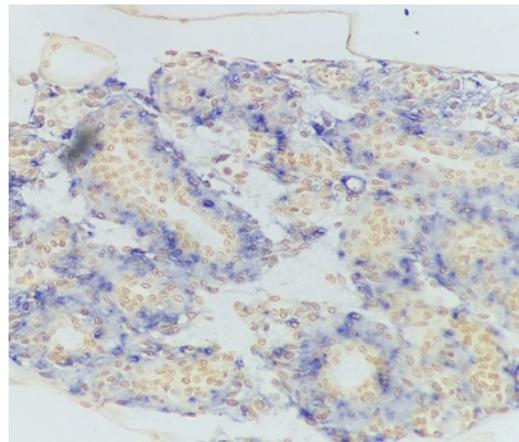


Figura 18 B. Seccion de organo linfoide de camaron control (+) despues del proceso de hibridacion In situ para IHNV (400 X)

En la figuras 18 A y B se observa la coloracion azul oscura en el organo linfoide. Esta coloracion indica que la sonda complementaria de IHNV se anilló al IHNV presente en el organo linfoide. La reacción colorimétrica la da la acción de la fosfatasa alcalina sobre el sustrato BNP.

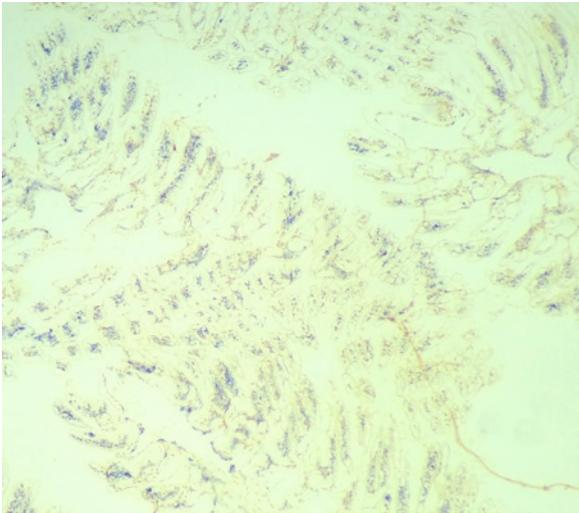


Figura 19 A. Seccion de branquias de camaron control (+) despues del proceso de hibridacion In situ para IHNV (40 X)

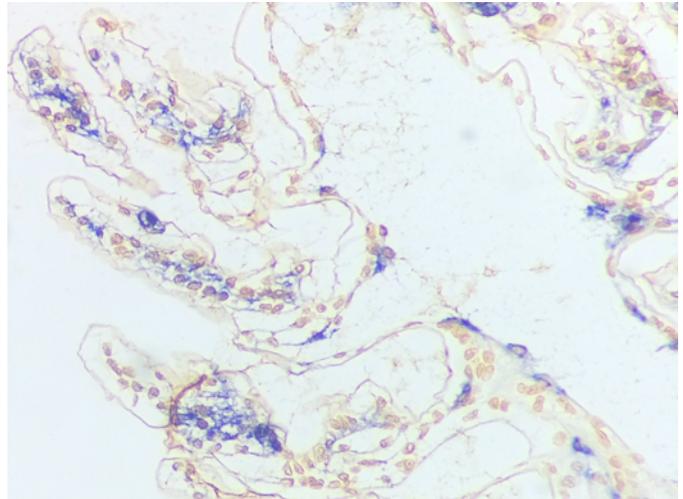


Figura 19 B. Seccion de branquias de camaron control (+) despues del proceso de hibridacion In situ para IHNV (400 X)

En secciones de branquias del camaron que se uso como control positivo, se observa igualmente una reaccion positiva azul, que indica que el ADN del IHNV estaba presente en los tejidos. En la figura 19 B se observa un cuerpo de inclusion intranuclear tipo Cowdry A en branquia.

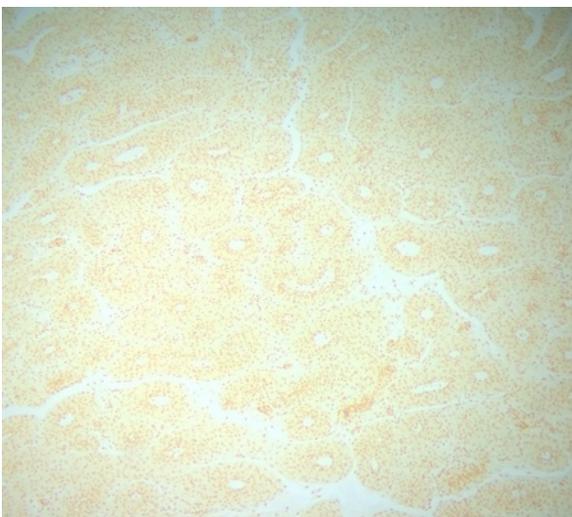


Figura 20 A. Seccion de organo linfoide de camaron PCR (+) para IHNV despues del proceso de hibridacion In situ para IHNV (40 X)

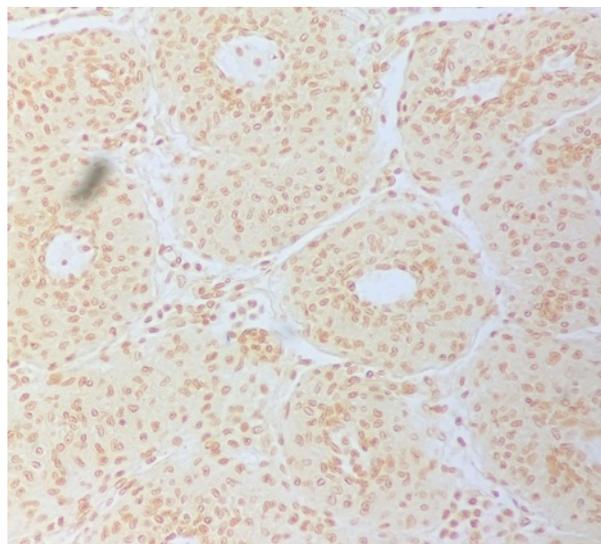


Figura 20 B. Seccion de organo linfoide de camaron PCR (+) para IHNV despues del proceso de hibridacion In situ para IHNV (400 X)

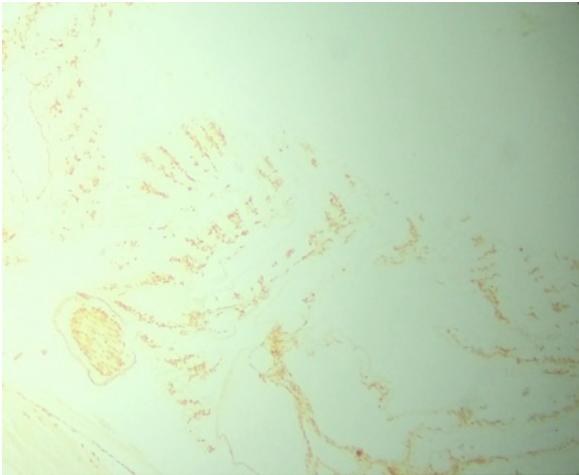


Figura 21 A. Sección de branquias de camarón PCR (+) para IHHNV después del proceso de hibridación *in situ* para IHHNV (40 X)

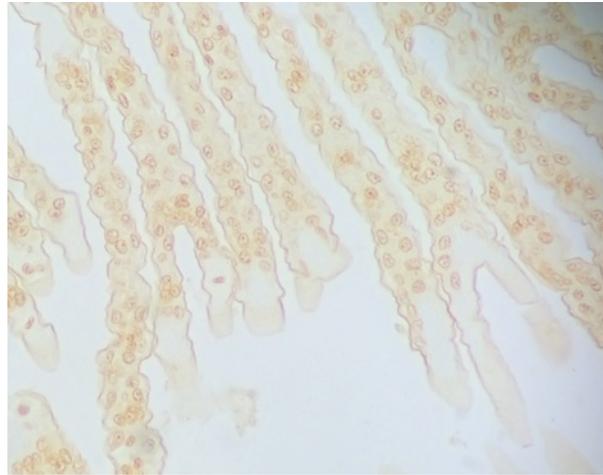
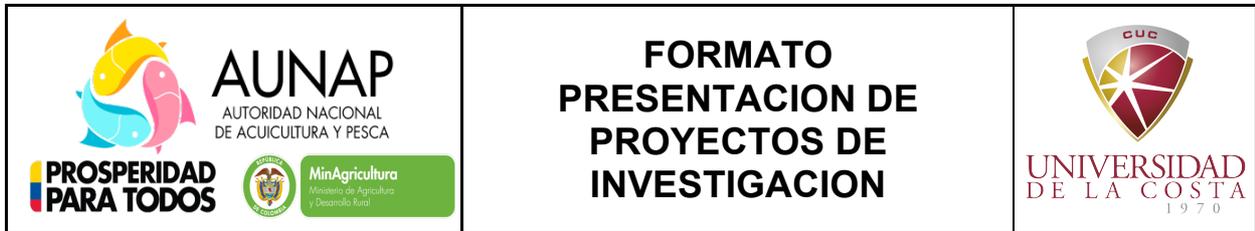


Figura 21 B. Sección de branquias de camarón PCR (+) para IHHNV después del proceso de hibridación *in situ* para IHHNV (400 X)

Las figuras 20 y 21 corresponden a camarones que presentaron resultados positivos de IHHNV por PCR a los cuales se les realizó la ISH. En ninguna de las muestras analizadas se presentó una reacción positiva que pudiese indicar la presencia del IHHNV en los tejidos. En todos los casos, los resultados fueron negativos indicando que el IHHNV no estaba presente en los tejidos de camarón.



CONCLUSIONES

Con base en los indicadores propuestos en esta investigación, se pudieron concluir exitosamente los objetivos planteados. A continuación se presentan los objetivos y los indicadores propuestos para este estudio y la conclusión para cada uno de estos

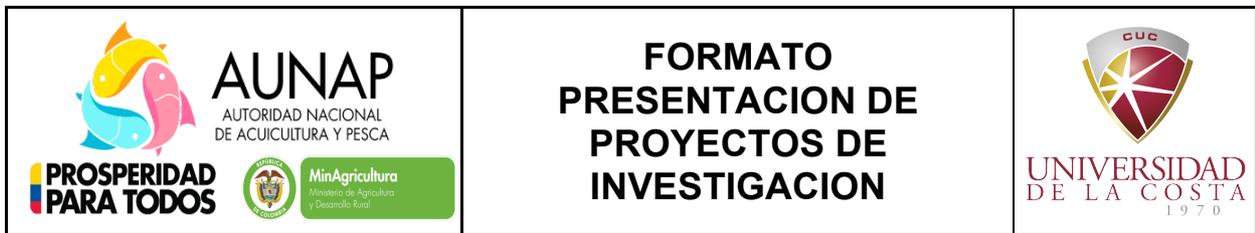
1. Determinar la prevalencia de IHHNV en los reproductores del lote actual programa de mejoramiento genético (500 camarones analizados)
 - Se logró determinar la prevalencia del IHHNV en las poblaciones de camarones mejorados genéticamente de CENIACUA la cual es del 17%.
 - En total se analizaron muestras de 498 reproductores, 98 familias en larvicultura y 70 familias de crecimiento 1 g
2. Seleccionar diferentes genes en el genoma de IHHNV y producir *in vitro* hebras dobles de ARN (dsARN) de estos genes (10 fragmentos dos genes)
 - Se estandarizó la técnica de producción de dsARN específica para IHHNV. Igualmente se produjo dsARN específico a partir de dos genes del IHHNV.
3. Determinar la eficacia de la introducción de los diferentes dsARN en la eliminación del virus en camarones portadores de IHHNV (100 camarones sometidos a dsARN y disminución del IHHNV en 1 log)
 - La prevalencia del IHHNV bajó del 17 % en los reproductores del lote 29-30, al 0% a nivel de marcación a 1 g en el lote 32 gracias a la eliminación de camarones positivos para IHHNV. Esto mostraría que no todas las familias tendrían integrado el genoma del IHHNV
 - La dsARN específica para IHHNV no pudo negativizar los camarones IHHNV (+) debido a que es altamente posible que el IHHNV presente en las muestras no es infeccioso. Esto se concluye basado en
 - El genoma total del IHHNV está presente en las muestras de camarón sin embargo no hay presencia de lesiones histológicas causadas por este virus
 - No se observó ADN del IHHNV en muestras sometidas a ISH

RECOMENDACIONES

La principal recomendación es confirmar la integración del IHHNV al genoma del camarón. Esto se puede hacer usando el procedimiento de "Genome Walker Universal kit" from BD Biosciences Clontech".

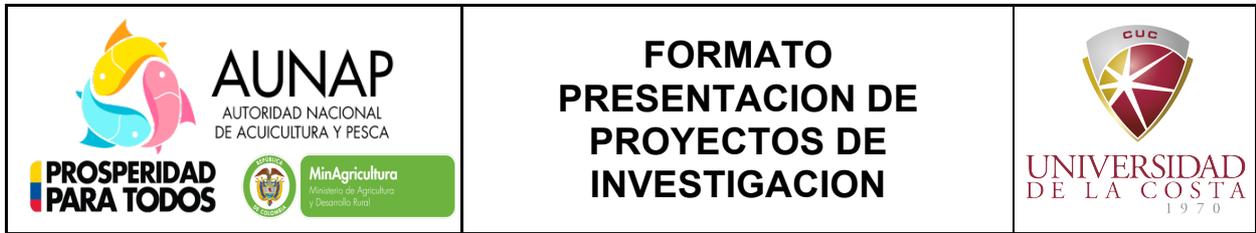
AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Ministerio de Agricultura por la financiación de este estudio. A la AUNAP-CUC por haber administrado los recursos de este proyecto



BIBLIOGRAFIA CITADA

- Bell TA, Lightner DV (1988) A handbook of normal penaeid shrimp histology.
- Bonami, J.R., Trumper, B., Mari, J., Brehelin, M., Lightner, D.V., 1990. Purification and characterization of the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. *J. Gen. Virol.* 71, 2657–2664.
- Bonnichon V, Lightner DV, Bonami JR (2006) Viral interference between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. *Dis Aquat Org* 72:179
- Durand S, Lightner DV 2002 Quantitative real-time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *J Fish Dis* 25:381–389
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2010) The state of world fisheries and aquaculture. United Nations Food and Agriculture Program.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2009) The state of world fisheries and aquaculture 2008. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome
- Fire, A., 1999. RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet.* 15, 358–363
- Fire A., 1998.; Xu, S.; Montgomery, M.K.; Kostas, S.A.; Driver, S.E. And Mello, C.C. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, 1998, vol. 391, no. 6669, p. 806-811.
- Ho, Teerapong, Pratchayapong Yasri, Sakol Panyim, Apinunt Udomkit 2011. Double-stranded RNA confers both preventive and therapeutic effects against *Penaeus stylirostris* densovirus (PstDNV) in *Litopenaeus vannamei*. *Virus Research* 155 (2011) 131–136
- Lightner DV 1996 A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA
- Mari, J., Bonami, J.R., Lightner, D.V., 1993. Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps; diagnosis of the disease using a specific probe. *J. Gen. Virol.* 74, 2637–2643.
- Nunan LM, Arce SM, Staha RJ, Lightner DV. 2001. Prevalence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and white spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* in the Pacific ocean off the coast of Panama. *J. World Aquac.Soc.* 32: 330–334.
- OIE (Office International des Epizooties/World Animal Health Organization), 2012. Aquatic Animal Health Code (2012), 14th ed. Office International des Epizooties, Paris. Article 1.3.3
- Robalino, J., Bartlett, T., Shepard, E., Prior, S., Jaramillo, G., Scura, E., Chapman, R.W., Gross, P.S., Browdy, C.L., Warr, G.W., 2005. Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response? *J. Virol.* 79, 13561–13571.
- Tang KF, Lightner DV 2002 Low sequence variation among isolates of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) originating from Hawaii and the Americas. *Dis Aquat Org* 49: 93–97



TanTang KF, Durand SV, White BL, Redman RM, Mohney LL, Lightner DV (2003) Induced resistance to white spot syndrome virus infection in *Penaeus stylirostris* through pre-infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus--a preliminary study. *Aquaculture* 216:19-29

Staroscik, A., 2004. URI genomics & sequencing center. <http://www.uri.edu/research/Gsc/resources/cndna.html>.