



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

**“INVESTIGACIÓN DE LA PRESENCIA DE SECUENCIAS DEL
VIRUS DE LA NECROSIS HIPODÉRMICA Y
HEMATOPOYÉTICA INFECCIOSA (IHHNV) EN EL GENOMA
DEL CAMARÓN *Penaeus vannamei*”**

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

INGENIERO EN ACUICULTURA

Presentado por:

CARLOS FELIPE SAMPEDRO CRUZ

GUAYAQUIL – ECUADOR

2010

AGRADECIMIENTO

A nuestro Dios todopoderoso por todas las bendiciones que nos da cada día de nuestras vidas.

A mi madre, Marcia Cruz M. por el enorme sacrificio que hace todos los días para empujarme hacia adelante y por el amor que me ha dado siempre.

A mi padre, Carlos Sampedro G. por el apoyo incondicional en todo momento y por darme el ejemplo de esfuerzo y constancia en la vida.

A Javier Robalino, Ph.D. por brindar la confianza y la oportunidad de la realización del presente trabajo, por impartir sus valiosos conocimientos durante el desarrollo de la tesis y por la colaboración para terminarla.

A Marcelo Muñoz, Ph.D. por ser un gran catedrático, el cual ha enseñado de manera invaluable en mi carrera universitaria.

A International Foundation for Science (IFS) Proyecto N° A/4420, por haber financiado este proyecto.

A BIOGEMAR S.A., empresa que me facilitó el espacio físico y los materiales para la realización de la tesis, también por compartir conocimientos en todo momento.

A Ricardo Cedeño, M.Sc. y a Martha Borbor, Blga., por su colaboración, amabilidad y disponibilidad durante mi estancia en el laboratorio de BIOGEMAR S.A.

A todos los docentes de la Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, quienes con honestidad y empeño han hecho un excelente trabajo en mi carrera profesional.

Finalmente agradezco a todas las personas que por su intervención hicieron posible el desarrollo de la tesis.

DEDICATORIA

A mis padres Marcia Cruz
M. y Carlos Sampedro G.

A mi hermano Henry
Romero C.

A mi hermana Lorena
Sampedro.

A mi familia.

A mis amigos.

TRIBUNAL DE GRADUACION

M.Sc. Jerry Landívar Z.
PRESIDENTE

Ph.D. Javier Robalino I.
DIRECTOR DE TESIS

Ph.D. Marcelo Muñoz N.
CO-DIRECTOR

Ph.D. Washington B. Cárdenas
VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)

Carlos Sampedro Cruz

RESUMEN

El virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) ha sido asociado con deformidades y con crecimiento retardado en *Penaeus vannamei* y en otros Peneidos. Sin embargo, en muchas instancias este virus parece co-existir con su huésped, alcanzando prevalencias cercanas al 100% en poblaciones de portadores aparentemente asintomáticos. La existencia de altos niveles de virus en ausencia de enfermedad podría indicar un estado de latencia, y un posible mecanismo por el cual el IHHNV sería capaz de establecer latencia mediante su integración en el genoma del hospedero.

El presente trabajo se planteó como objetivo determinar la presencia de secuencias genéticas del IHHNV integrados en el genoma de *P. vannamei* utilizando las técnicas de Southern blot y PCR inversa. Se analizaron para este efecto muestras de ADN genómico provenientes de reproductores de un laboratorio de maduración (BIOGEMAR S.A., Santa Elena, Ecuador). Los resultados de esta investigación no encontró evidencia de integración de ADN de IHHNV en la población de *P. vannamei* analizada, a pesar de observarse una elevada prevalencia del virus dentro de la población. Estos resultados favorecerían la hipótesis de IHHNV infeccioso como fuente de las altas prevalencias observadas en poblaciones domesticadas en Ecuador, aunque la posibilidad de integración del ADN viral en esta u otras

poblaciones de cultivo no puede aun ser descartada. Futuros estudios serán necesarios para clarificar la posible contribución de integración viral sobre la epidemiología de IHHNV.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	vi
ÍNDICE GENERAL.....	viii
ABREVIATURAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
INDICE DE TABLAS.....	xiv
CAPITULO 1	
1. ANTECEDENTES.....	1
1.1 Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa.....	3
1.1.1 Biología molecular del virus.....	3
1.1.2 Epidemiología.....	7
1.1.3 Signos clínicos del IHHNV en <i>P. vannamei</i>	8
1.2 Integración viral.....	10
1.2.1 Virus Asociados a Adenovirus (AAV) como modelo de integración viral.....	10
1.2.1.1. Mecanismos de Integración de AAV.....	11

1.2.1.2. Consecuencias de la Integración Viral para el Huésped.....	13
1.2.2. Evidencia de integración del IHHNV en <i>P. monodon</i>	14

CAPITULO 2

2. Materiales y Métodos.....	17
2.1. Extracción de ADN.....	17
2.2. Electroforesis.....	20
2.3 Diagnóstico del IHHNV mediante PCR.....	21
2.4 Preparación de Sondas.....	21
2.5. Southern blot.....	23
2.6. PCR Inversa.....	26

CAPÍTULO 3

3. Resultados.....	30
3.1. Implementación de protocolos para extracción de ADN genómico de <i>P. vannamei</i>	30
3.2. Diseño de sondas para Southern blot.....	32
3.3. Patrones de hibridación asociados con IHHNV: Southern	

blot.....	35
3.4. Resultados de PCR Inversa	48
4. Discusión.....	53
Conclusiones.....	56
Recomendaciones.....	57
Anexos	
Bibliografía	

ABREVIATURAS

AAV	Virus asociados a adenovirus	NaOH	Hidróxido de sodio
ADN	Acido desoxirribonucleico	nm	nanómetro (10^{-9} m)
ATP	Adenosin trifosfato	°C	Grados centígrados
$C_6H_5Na_3O_7$	Citrato de sodio	ORF	Marco abierto de lectura
CTAB	Bromuro trimetil cetílico del amonio	P.	Penaeus
dNTP	Deoxirribonucleótido trifosfato	Pb	Pares de bases
dUTP	deoxi-uridina trifosfato	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético	pg	Picogramos (10^{-12} g)
g.	Gramos	pH	Potencial de hidrógeno
HCl	Acido Clorhídrico	RDS	Síndrome del rostrum deforme
IHHNV	Virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa	RE	Enzima de restricción
ITR	Repeticiones terminales invertidas	RPM	Revoluciones por minuto
KCl	Cloruro de potasio	RCF	Fuerza centrífuga relativa
KDa	Kilodalton	SDS	Dodecil sulfato de sodio
M	Molar	SSC	Citrato de sodio salino
mg.	Miligramos (10^{-3} g)	TAE	Tris Acido Acético
$MgCl_2$	Cloruro de magnesio	Taq	Enzima de ADN polimerasa del <i>Thermus aquaticus</i>
ml	Mililitros (10^{-3} litros)	TBS	Tris buffer salino
mM	Milimolar (10^{-3} molar)	µg	Microgramos (10^{-6} g)
MPM	Marcador de peso molecular	µl	Microlitros (10^{-6} litros)
NaCl	Cloruro de sodio	µM	Micromolar (10^{-6} molar)
$NaHPO_4$	Fosfato ácido de sodio	UV	Ultravioleta

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Organización de los promotores y ORF's a lo largo del genoma del IHHNV.	6
Figura 2. Repeticiones terminales del genoma del IHHNV con extensas regiones de complementariedad.....	12
Figura 3. Esquema de la técnica de Southern blot.....	26
Figura 4. Esquema general de la PCR inversa.....	27
Figura 5. ADN genómico aislado de hemolinfa de reproductores con el kit Easy DNA™ y resuelto en agarosa al 0.8%.....	32
Figura 6. Esquema general de la hibridación de las sondas sobre el genoma del IHHNV y los sitios de corte en el genoma del virus.....	33
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de sondas con y sin digoxigenina.....	35
Figura 8. Sensibilidad del protocolo de Southern blot.....	36
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de diagnóstico de	

de IHHNV en muestras de ADN de reproductores.....	38
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de ADN genómico digerido con las enzimas Eco RI, Pvu II y Bam HI.....	40
Figura 11. Esquema de acción de las enzimas sobre el ADN de simple cadena del virus y ADN de doble cadena del camarón.....	42
Figura 12. Esquema general de integración viral, digestión con Eco RI y Southern blot.....	43
Figura 13. Esquema general de integración viral, digestión con Pvu II y Southern blot.....	44
Figura 14. Esquema general de integración viral, digestión con Eco RI y Pvu II, y Southern blot.....	45
Figura 15. Patrón de hibridación único observado en ADN de animales portadores del IHHNV.....	48
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR inversa con las diferentes combinaciones de iniciadores.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla I. Nombre y secuencia de los iniciadores usados para amplificar las sondas	22
Tabla II. Programas usados en el termociclador para la amplificación de las tres sondas mediante la PCR.....	22
Tabla III. Cuadro comparativo entre los diferentes protocolos de extracción de ADN genómico en diferentes tejidos.....	31
Tabla IV. Denominaciones y secuencias de los iniciadores usados en la PCR inversa.....	49
Tabla V. Combinación de iniciadores y tamaño de fragmentos de los productos de PCR de cada combinación.....	50

CAPITULO 1

1. ANTECEDENTES

El virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (IHHNV) es un patógeno prevalente en el cultivo de camarón blanco *Penaeus vannamei* (1). La presencia del IHHNV ha sido asociada con el Síndrome del Rostrum Deforme (RDS, siglas en inglés), denominado así por las deformidades físicas aparentes en animales infectados (2). La enfermedad tiene, además de las deformaciones del rostrum, efectos adversos en el crecimiento (*i.e.*, *enanismo*), lo cual perjudica la comercialización del camarón cultivado (2).

A nivel de diagnóstico, uno de los principales métodos utilizados para detectar IHHNV es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés). Este método, de alta especificidad y sensibilidad, es aceptado en la mayoría de los laboratorios donde se cultiva camarón con el objetivo principal de obtener animales libres de IHHNV (3).

La presencia de IHHNV en el huésped no está necesariamente ligada al desarrollo del RDS. En efecto, hay casos documentados de presencia de IHHNV en animales aparentemente asintomáticos (4, 5). Esto sugiere que el virus ha adoptado formas alternativas de infección, caracterizadas por la aparente ausencia de sintomatología (6). Infecciones asintomáticas son comunes en muchos tipos de virus, y pueden estar asociadas con estados de latencia que muchas veces van acompañados de secuencias virales en el genoma del huésped (7, 8). En el caso del IHHNV, hay estudios cuyos resultados son consistentes con la hipótesis de integración. De hecho, estudios realizados en *P. monodon* determinaron la presencia de secuencias relacionadas al IHHNV integradas en el genoma de esta especie (6).

El presente trabajo de Tesis, se intentó demostrar la existencia de secuencias genéticas relacionadas con el IHHNV en el genoma del camarón *P. vannamei*. La posible existencia de eventos de integración del IHHNV en portadores asintomáticos de *P. vannamei* tiene importantes implicaciones para el desarrollo de estrategias de control de RDS. Este conocimiento se vuelve esencial para poder diseñar métodos de diagnóstico más informativos (*i.e.*, que distingan el ADN viral integrado del no integrado), que permiten comprender y controlar la transmisión del virus en poblaciones de cultivo.

En esta investigación se utilizaron técnicas moleculares como Southern blot y PCR inversa para evaluar la posible integración de IHHNV en

P. vannamei. Estas técnicas han sido usadas en otras especies para la determinación de ADN viral integrado en el genoma del hospedero (9, 10).

1.1. Virus de la Necrosis Hipodérmica Hematopoyética Infecciosa

1.1.1. Biología Molecular del Virus.

El virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) es un virión icosaédrico no envuelto, de 22 nanómetros (nm) de diámetro, posee un genoma de ADN de simple cadena con un tamaño aproximado de 4.1 kilobases (kb), y una densidad de 1.40 g/ml en CsCl (cloruro de cesio). La cápside está compuesta de cuatro polipéptidos con tamaños moleculares de 74 Kilo Daltons kDa, 47 kDa, 39 kDa y 37.5 kDa (11). El potencial codificante del virus está comprendido en tres marcos abiertos de lectura (ORF por sus siglas en inglés) (12, 13).

Basado en las propiedades fisicoquímicas y ultraestructurales de los viriones y la caracterización parcial de proteínas virales, el IHHNV fue tentativamente asignado a la familia *Parvoviridae* (11, 12).

La familia *Parvoviridae* incluye dos subfamilias, *Parvovirinae*, cuyos miembros infectan vertebrados, y *Densovirinae*, cuyos miembros infectan invertebrados.

Los Parvovirus son pequeñas partículas icosaédricas, sin envoltura de 18-26 nm de diámetro con ADN lineal de cadena simple y con un genoma entre 3900 y 5900 nucleótidos (14)

En los extremos 5' y 3' del genoma, los Parvovirus contienen pequeñas secuencias palindrómicas que forman estructuras de horquillas necesarias para la activación de la replicación y encapsidación del genoma viral (15 - 17).

Los Densovirus son altamente patógenos para sus huéspedes y causan enfermedades conocidas como "densonucleosis" (18). El término densonucleosis se debe a las características estructurales e histopatológicas de núcleos hipertrofiados y densos en células de larvas invertebrados infectadas.

La secuencia completa de ADN del IHHNV ha sido determinada, revelando tres marcos de lectura a lo largo de 2988 nucleótidos en la cadena positiva (13).

La organización y el tamaño de las secuencias codificantes del genoma de IHHNV son muy similares a los virus *Aa/DNV* (*Aedes albopictus*) y *Aae/DNV* (*Aedes aegypti*) (19, 20) los dos virus representativos del género *Brevidensovirus*.

Las características de los tres ORF's, nombrados como izquierdo, medio y derecho son las siguientes (13):

ORF izquierdo.- El codón ATG de este ORF empieza en el nucleótido 599, lo que implica un producto de traducción esperado de 666 aminoácidos, correspondiente a una masa molecular de 75.77 kDa. Se encontró identidad parcial de esta proteína con la proteína no estructural (NS-1) del Brevidensovirus del mosquito y de muchos otros Parvovirus. Esto implica que el ORF izquierdo puede codificar una proteína no estructural, con funciones similares a otros miembros del grupo que incluyen: regular el empaquetamiento del ADN viral (21), estimular la expresión del gen de la cápside (22), apoptosis, y actividad citotóxica y oncolítica (23 - 25).

ORF medio.- El potencial del codón de iniciación del ORF medio empieza en el nucleótido 543 (56 nucleótidos 5' del ATG del ORF izquierdo). Este ORF por lo tanto se encuentra superimpuesto con el ORF izquierdo, pero en un marco de lectura distinto. El ORF medio codificaría una proteína esperada de 363 aminoácidos con una masa molecular de 42.11 kDa. No se ha encontrado similitud de este ORF con los otros Parvovirus. Sin embargo por su posición en el genoma al igual que en los Brevidensovirus y Parvovirus, el ORF medio del IHHNV codificaría la segunda proteína no estructural (NS-2) cuya función es desconocida (13).

ORF derecho.- El codón de iniciación del ORF derecho empieza en el nucleótido 2541. El ORF derecho codificaría una proteína esperada de 329 aminoácidos, con una masa molecular de 37.48 kDa. Por analogía con otros Parvovirus, se presume que el ORF derecho codifica las proteínas estructurales de la cápside, a pesar de no haber homología entre IHHNV y otros Parvovirus a este nivel (13).

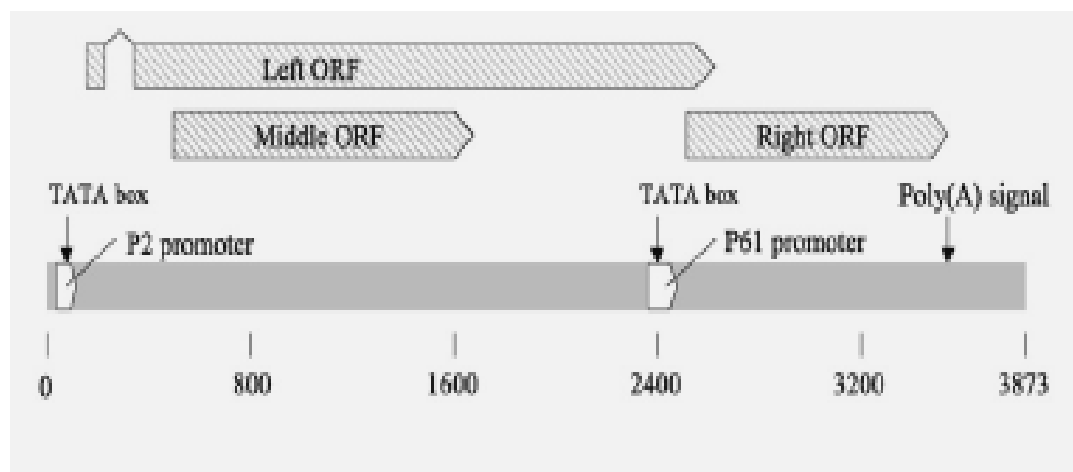


Figura 1. Organización de los promotores y ORF's a lo largo del genoma del IHHNV. Adaptado de Dhar et al., 2007

El genoma del IHHNV tiene en los extremos 5' y 3' secuencias palindrómicas cortas, capaces de formar estructuras tipo horquillas por medio de apareamiento de bases (13), característica que es compartida en todos los Parvovirus estudiados hasta ahora (26).

En el genoma del virus se han encontrado dos promotores, denominados P2 y P61, los cuales se piensa regulan la expresión de los ORF izquierdo y derecho respectivamente. La actividad de estos dos

promotores ha sido evaluada en células de insecto, células de peces y en cola de camarón *P. vannamei* (27). Los resultados de estos estudios indicaron que los promotores P2 y P61 tienen el potencial para regular la expresión de genes adyacentes tanto en sistemas vertebrados como invertebrados (27). En IHHNV, el promotor P2 regularía la expresión del gen de la proteína no-estructural (NS)-1 y el promotor P61 regularía la expresión de genes de proteínas estructurales (13).

1.1.2. Epidemiología

Transmisión

Infección por el IHHNV puede ocurrir por transmisión horizontal a través de ingestión de animales muertos infectados o por el contacto con el agua que contiene animales infectados (28). La transmisión también puede ser vertical, lo que sugiere la presencia de IHHNV en ovarios de hembras infectadas en *P. vannamei* (29). La transmisión vertical puede ser un factor crucial en la prevalencia de IHHNV de generación en generación en animales domesticados.

La transmisión del IHHNV ha sido demostrada experimentalmente por inyección de suspensión viral, por ingestión de material infectado y por inmersión en agua contaminada (28, 30).

Especies Afectadas

IHHNV no solamente ha sido reportado en especies que comúnmente se cultivan en las Américas como son el camarón blanco (*P. vannamei*) y el camarón azul (*P. stylirostris*); sino también en otras especies como el camarón café (*P. californiensis*) (31).

La enfermedad es altamente letal en juveniles de *P. stylirostris*, causando mortalidades superiores al 90% (32).

El IHHNV es menos virulento en *P. vannamei* y no causa mortalidades como las observadas en *P. stylirostris*. Sin embargo, la infección puede causar deformidades y bajas tasas de crecimiento, repercutiendo en la comercialización del crustáceo (2, 30, 33).

En el medio natural, las infecciones con IHHNV han sido reportadas en otras especies tales como *P. monodon*, *P. semisulcatus*, *P. chinensis*, *P. japonicus* y *P. occidentalis* (34 - 38). Debido a que otras especies de Peneidos como *P. setiferus*, *P. duorarum* y *P. aztecus* han podido ser infectadas en condiciones de laboratorio (39), es probable que ocurran infecciones naturales en éstas y otras especies. Existen especies tales como *P. indicus* y *P. merguensis* que son refractarias al IHHNV (39).

1.1.3. Signos clínicos del IHHNV en *P. vannamei*

Por muchas razones, incluida la capacidad del virus para causar serias epizootias en *P. stylirostris* e infectar otras especies de Peneidos, el IHHNV ha sido registrado como un patógeno económicamente importante por el Gulf Coast Research Marine Shrimp Farming Consortium (41).

La reducción en el tamaño y la disparidad de tallas, causadas por infecciones de IHHNV en *P. vannamei* tiene un impacto importante en la producción de este Peneido, resultando en pérdidas estimadas entre el 10% y 50% de la producción final (42).

El IHHNV infecta los tejidos ectodermales y mesodermales. Entre los tejidos ectodermales infecta las branquias, la epidermis cuticular, el epitelio hipodermal del intestino anterior y posterior, el cordón y ganglios nerviosos. Mientras que en los tejidos mesodermales infecta el tejido hematopoyético, la glándula antenal, los órganos linfoides, el tejido conectivo y el músculo estriado (30, 43).

Los signos de la enfermedad no son específicos, pero en camarones juveniles se nota una reducción en el consumo de alimento cuando la infección es aguda; además de cambios de comportamiento y apariencia (39). En el comportamiento se observa que los juveniles nadan lentamente hacia la superficie, luego voltean el vientre hacia arriba y se dejan hundir hasta llegar al fondo (40). En la apariencia se observa que el animal adquiere

un color blanquecino, que puede ser transitorio o no. También se ha observado una coloración azulada y una opacidad en la musculatura abdominal.

Se han identificado al menos cuatro genotipos diferentes del IHNV (44, 45), pero sólo dos genotipos se ha demostrado que son infecciosos para *P. vannamei* y/o *P. monodon*.

1.2. Integración Viral

1.2.1. Virus Asociados a Adenovirus (AAV) como Modelo de Integración Viral

El virión del virus adeno-asociado (AAV) es icosaédrico con diámetro de 20-30 nm, no presenta envoltura, y tiene un genoma de ADN cadena simple de alrededor de 5 kb. Los AAV pertenecen al género *Dependovirus* dentro de la familia *Parvoviridae*, son llamados así porque usualmente requieren de otro virus (*e.g.* Adenovirus) para completar su ciclo infeccioso (46). Los AAV han sido aislados de algunas especies, como pollos y humanos (47). Debido a la exigencia del AAV de requerir un virus colaborador para infectar, se considera a este virus como defectuoso en su replicación. El genoma del AAV está programado para reprimir su expresión génica necesaria para la infección productiva de manera que el genoma viral puede integrarse en el huésped para establecer una infección latente (47).

La secuencia de los 4680 nucleótidos del genoma del AAV ha sido determinada (48). Hay dos grandes marcos abiertos de lectura (ORF) superpuestos: el ORF 5 ' codifica cuatro

proteínas no estructurales reguladoras (Reps), con superposición ORF's, mientras que el ORF 3' codifica tres proteínas estructurales, igualmente con superposición de sus ORF's.

El genoma del AAV está flanqueado por dos secuencias terminales llamadas ITR's (Inverted Terminal Repeats) de 145 nucleótidos, de los cuales 125 forman una estructura secundaria de horquilla tipo "T" por tener secuencias palindrómicas (Fig. 2). Los ITR's funcionan como iniciadores para la replicación del ADN y la formación de la doble cadena, además mantienen la integridad de los extremos, y en estas regiones se localizan las secuencias que le permiten la recombinación con el ADN del huésped (49).

1.2.1.1. Mecanismos de Integración de AAV

En condiciones de infección no permisivas, es decir en ausencia de confección por un virus colaborador, la partícula del AAV entra en la célula y penetra hasta el núcleo, y una pequeña cantidad de proteínas Reps es sintetizada. Evidencias indirectas sugieren que las Reps pueden inhibir la replicación del ADN viral bajo estas condiciones no permisivas (50). La consecuencia de esta inhibición sería favorecer la integración del genoma del AAV en el genoma celular.

En líneas celulares humanas, el AAV se integra en un lugar específico en el cromosoma 19q13.3qter (locus AAVS1), de 70% a 100% de las ocasiones (51 - 53). La integración en este sitio depende de una porción de 510 pb en el ADN del huésped, el cual es reconocido por la maquinaria de integración del AAV. El sitio preciso del evento de integración es variable, con un rango de varios cientos de pares de bases de distancia entre la señal de integración y la coyuntura virus/hospedero. Tres regiones cortas dentro de la región de 510 pb son críticas para la integración de AAV en el cromosoma 19: la secuencia repetitiva (GCTC)₃, que es reconocida por proteínas Reps, el sitio de resolución terminal en donde Reps corta el ADN; y un tercer sitio que parece cumplir el rol de aumentador de eventos de recombinación (54).

Las proteínas Rep68 y Rep78, derivadas del ORF 5' reconocen una secuencia de unión en la horquilla del AAV llamada sitio AP1, el cual es una secuencia repetitiva GCTC, homóloga a la región (GCTC)₃ del sitio de integración en el ADN del hospedero. Rep68/78 forman un complejo junto con las secuencias GCTC en ambos ADN, y con su actividad helicasa y endonucleasa facilitan la recombinación para llevar a cabo la integración (54).

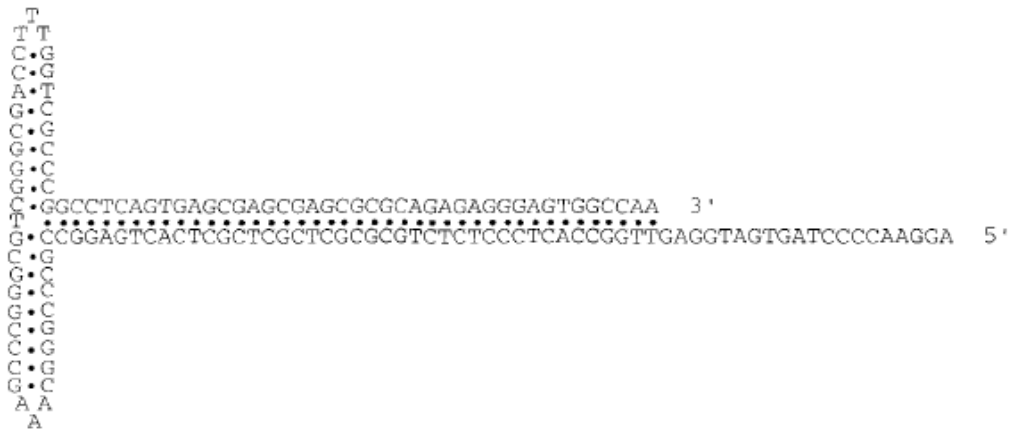


Figura 2. Repeticiones terminales del genoma del IHHNV con extensas regiones de complementariedad. Las repeticiones permiten la formación de horquillas y esta estructura se forma en la fase de replicación viral (tomado de Berns y Linden, 1994).

Estudios iniciales para caracterizar el estado del ADN viral en células con infección latente fueron hechos por reasociación de ADN genómico desnaturalizado en solución (55) y por Southern blot de ADN genómico digerido con endonucleasas de restricción que no tienen un sitio de reconocimiento dentro del genoma de AAV (9). Estos estudios determinaron que el ADN proviral estaba covalentemente unido a un ADN celular de alto peso molecular.

1.2.1.2. Consecuencias de la Integración Viral para el Huésped

Para un virus críptico como el AAV, la infección latente puede tener poco o ningún efecto sobre la célula huésped. Sin embargo, hay que considerar que el genoma viral se inserta en una secuencia que se expresa en varios tejidos, y que las proteínas Reps, codificadas en el ADN viral integrado, tienen el potencial de alterar significativamente la

expresión génica del hospedero. Sin embargo, a medida que la valoración de los cambios fenotípicos se ha vuelto más sofisticada, ha resultado obvio que la infección latente del AAV no afecta ni al fenotipo ni a la expresión de genes celulares específicos (56, 57).

Por otro lado, en experimentos con células embrionarias de hámster, sometidas a infección latente, se observó que la integración del AAV incrementó su sensibilidad a la irradiación UV. La presencia de AAV se asoció además con una disminución en la habilidad celular para amplificar genes como respuesta a irradiación UV (58). Aunque estos efectos podrían ser el resultado de mutaciones causadas en el sitio de inserción, es más probable que se deban a la expresión de los genes Repts. Las proteínas Repts tienen una gran capacidad para modificar la expresión génica del hospedero, y bajo condiciones donde la expresión de Rep no se reprime, una variedad de fenómenos citotóxicos han sido observados (58).

La ausencia de efectos negativos sobre las células que portan infecciones latentes con AAV es un aspecto crítico para el establecimiento de infecciones latentes productivas por parte del AAV, en las cuales el ADN viral es perpetuado junto con el del huésped (58).

1.2.2. Evidencia de Integración del IHHNV en *P. monodon*

Dos genotipos (nombrados A y B), relativamente divergentes con respecto a la secuencia referencial del IHHNV, han sido observados en especímenes de *P. monodon* provenientes de Madagascar y Australia (tipo A), o de Tanzania (tipo B) (59). Material proveniente de animales portadores de estos genotipos carece de potencial infeccioso. Análisis posteriores demostraron que ambos genotipos pueden coexistir en individuos

provenientes de Tanzania y de Mozambique, y que estas secuencias relacionadas con el IHHNV, se encuentran presentes en todos o casi todos los animales provenientes de Africa, monitoreados en diagnóstico rutinario (6). Este conjunto de observaciones sugiere que estas secuencias podrían estar asociadas con vestigios de IHHNV integrados en el genoma de *P. monodon*, o con virus defectuosos. En efecto, un fragmento de ADN de 1903 pares de bases, incluyendo el extremo 3' del genotipo A, fue clonado a partir de ADN de *P. monodon* digerido con enzimas de restricción y ligado a adaptadores universales (6). El fragmento de 1.9 kb correspondió al extremo 3' terminal del genotipo A de IHHNV, adyacente a una secuencia no perteneciente a IHHNV. Esta secuencia no viral contiene unidades repetitivas previamente identificadas como marcadores genéticos en *P. vannamei* y *P. monodon*, a más de una región con homología a un retrotransposón (6).

Estos resultados demuestran la presencia de ADN derivado del IHHNV integrado en el genoma de *P. monodon*. Un análisis preliminar de la distribución geográfica de este ADN integrado parece indicar que está restringido a poblaciones de *P. monodon* de Africa y Australia, y ausente de poblaciones Asiáticas (6).

El trabajo de Katty F.J. Tang y Donald V. Lightner es el primer informe de integración del IHHNV en el genoma de un camarón marino. La integración de un Parvovirus en el genoma del huésped no es inusual y ha sido reportada en otras especies. Por ejemplo, el virus asociado a

Adenovirus (AAV), discutido en la sección anterior, se integra en el ADN humano en sitios específicos a través de recombinación no homóloga (49, 59). En el caso del AAV, esta integración está asociada con latencia, pero no hay estudios que hayan explorado hasta la fecha las consecuencias de la integración del IHNV en *P. monodon*.

El análisis de secuencias del IHNV proveniente de distintas regiones geográficas ha revelado, en general, poca variación, con niveles de identidad (en nucleótidos) mayores al 96% (59). Sin embargo, las secuencias del IHNV integradas en poblaciones Africanas de *P. monodon* son significativamente más divergentes (86%) (6). Este conjunto de observaciones sugiere que los eventos de integración documentados hasta la fecha en *P. monodon* son posiblemente ancestrales, ya que han encontrado un número significativo de mutaciones en aislados de IHNV provenientes de África y Australia, que distinguen a estas secuencias de los aislados de IHNV infecciosos que actualmente prevalecen en poblaciones de Peneidos.

CAPITULO 2

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Extracción de ADN

Los camarones *P. vannamei* fueron obtenidos del área de maduración de un laboratorio de larvas de producción comercial (BIOGEMAR S.A). Los reproductores seleccionados, aparentemente saludables, tuvieron un peso promedio de 30 g. Varios protocolos fueron evaluados con el fin de determinar un procedimiento adecuado para la obtención de ADN en suficiente cantidad y calidad para pruebas de Southern blot (ver Capítulo 3).

Se utilizó espectrofotometría para evaluar la cantidad de ADN obtenida con cada protocolo y se utilizó el cociente entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm como indicador de la pureza del ADN (61). El ADN obtenido se analizó con electroforesis en geles de agarosa, para determinar la presencia de ADN de alto peso molecular y ausencia de productos de degradación.

Los protocolos de extracción de ADN ensayados se describen a continuación:

Extracción con CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide):

En un microtubo estéril de 1.5 ml se adicionó 500 µl de buffer CTAB (20mM EDTA, 100mM TRIS-HCl pH 8.0, 1.4M NaCl, 2% (Masa/Volumen) CTAB, 0,2% (Volumen/Volumen) 2-mercaptoetanol y 20 µl de proteinasa K (20 µg/µl)). Luego se colocó aproximadamente 50 mg de tejido animal finalmente fraccionado. La extracción se realizó a 55 °C por 4 horas o más, dependiendo de la disolución del tejido. El extracto se clarificó por centrifugación a 14.000 RPM por 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se pasó a un nuevo microtubo y se adicionó 1 volumen de fenol-cloroformo (1:1) se mezcló con vórtex. Luego de centrifugar bajo condiciones similares, se transfirió la fase acuosa a un nuevo microtubo donde se adicionó 1 volumen de cloroformo y se mezcló invirtiendo el tubo varias veces. Inmediatamente se volvió a centrifugar bajo condiciones similares y la fase acuosa se precipitó en un nuevo microtubo, con 0.7 volúmenes de isopropanol. Luego de mezclar suavemente, se centrifugó el precipitado a 14.000 RPM por 10 min a temperatura ambiente. El pellet de ADN se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 100 µl de agua ultra-pura.

Extracción con Isothiocianato de Guanidina

El protocolo es esencialmente el mismo descrito para CTAB, pero utilizando como solución tampón el isothiocianato de Guanidina (4M Tiocianato de guanidina, 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5).

Extracción con Pure Link™ kit (Invitrogen)

Se siguió el protocolo del fabricante, con ciertas modificaciones: Aproximadamente 50 mg de tejido finamente fraccionado se utilizó para su extracción con una mezcla de 180 µl Buffer PureLink™ Genomic Digestion y 20 µl de Proteínasa K (incluido en el Kit) en el tubo. En un microtubo el extracto se incubó a 55 °C durante la noche con agitaciones intermitentes. El extracto se clarificó por centrifugación a 14.000 RPM por 3 min a temperatura ambiente y luego se procedió según el fabricante.

Extracción con Easy DNA™ kit (Invitrogen)

Se recolectó diferentes tejidos del camarón y cada fragmento del tejido fue depositado en un tubo estéril de 1.5 ml. Se procedió a seguir el protocolo según el fabricante.

Se ensayaron los protocolos descritos anteriormente en diferentes tejidos obtenidos de reproductores: hepatopáncreas, epitelio, músculo, branquias y hemolinfa. Finalmente se utilizó el protocolo del kit Easy DNA™ para la extracción de ADN (ver capítulo 3). El protocolo final utilizado para obtener muestras para pruebas de Southern blot fue el siguiente: En una

jeringuilla de 1 ml conteniendo 300 µl de $C_6H_5Na_3O_7$ al 10% (anticoagulante) se obtuvo, del seno ventral del reproductor, 700 µl de hemolinfa para luego ser depositada en un tubo estéril de 2 ml. Las muestras centrifugaron a 800 rcf por 10 minutos a temperatura ambiente, El sobrenadante se descartó y el pellet celular se resuspendió en 200 µl de TBS. A continuación se prosiguió con el protocolo del kit.

2.2 Electroforesis

En la presente investigación se realizó la electroforesis en varias etapas del proyecto. Se utilizó agarosa ultrapura Invitrogen al 1.2% para observar el amplicón diagnóstico del IHNV en los reproductores muestreados, observar las sondas amplificadas y los productos de PCR inversa. Se utilizó agarosa al 0.8% para observar la presencia y calidad del ADN extraído y agarosa al 1% para la migración de ADN digerido con enzimas de restricción para las pruebas de Southern blot. El gel se preparó solución TAE 1X (40 mM de Tris Acetato y 1 mM de EDTA) con bromuro de etidio. El ADN fue migrado a 90 voltios por una hora, excepto las muestras de ADN digerido con enzimas de restricción, las cuales se migraron a 60 voltios por 7 horas. Luego de cada electroforesis los geles se visualizaron en un transiluminador UV.

2.3 Diagnóstico del IHNV Mediante PCR

Las muestras de ADN fueron analizadas, para determinar la presencia del IHHNV, mediante PCR utilizando iniciadores 5'-AATTCGACGCTGCCAATGAT -3' y 5'-GCCAATGTTACGTCGGCTTC-3', con amplicón esperado de 346 pb. La reacción se realizó en 20 µl con la siguiente composición: 2 µl de Buffer 10X (200mM de Tris-Cl pH 8.4, 500 mM de KCl), 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.5 µM de cada iniciador, 1 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen), 13.8 µl de agua ultrapura y 1 µl de ADN molde.

El programa de amplificación fue el siguiente: 1 ciclo a 95°C por 3 min, para la desnaturalización inicial; 40 ciclos de un paso de desnaturalización a 95°C por 30 segundos seguidos de un paso de hibridación a 58°C por 30 segundos y un paso de extensión a 72°C por 1 minuto y finalmente 1 ciclo de 72°C por 3 minutos.

2.4 Preparación de Sondas.

Se hicieron por PCR, amplificando tres segmentos diferentes del genoma viral utilizando muestras de animales infectados con IHHNV. Los tres segmentos se denominaron Sonda 1, Sonda 2 y Sonda 3 sintetizadas con sus respectivos iniciadores (ver tabla I). Las condiciones de amplificación se describen en la Tabla II.

Nombre de la	Nombre del	Secuencia del iniciador (5'-3')
--------------	------------	---------------------------------

Sonda	Iniciador	
Sonda 1	IHHNV-NSFW T3	gaattaaccctcactaaagggacagtgtctacactgtcatcc
	IHHNV- NSREV- Xho	gctcgagaggaatctgatgtgtcactg
Sonda 2	1FW-1820- IHHNV	ccaacaatacagaagagacga
	4REV-2780- IHHNV	tggatctttccttgggcttg
Sonda 3	3FW-2501- IHHNV	agagtcagaaattatgggacg
	IHHNV-6	gccaatgttacgtcggttc

Tabla I. Nombre y secuencia de los iniciadores usados para amplificar las sondas.

Tipo de Sonda	Temperatura (°C)	Tiempo	# Ciclo
SONDA 1	95	3 min	1
	95	20 seg	40
	62	20 seg	
	72	1 min	1
	72	1 min	
	10	1 min	1
SONDA 2	95	3 min	1
	95	20 seg	38
	55	20 seg	
	72	1 min	1
	72	1 min	
	10	1 min	1
SONDA 3	95	3 min	1
	95	20 seg	40
	54	20 seg	
	72	1 min	1
	72	1 min	
	10	1 min	1

Tabla II. Programas usados en el termociclador para la amplificación de las tres sondas mediante la PCR.

Las Sondas se purificaron de un gel de agarosa con un kit QIAquick (Qiagen) y enviados a secuenciar por un proveedor comercial (Macrogen, Corea del Sur).

El método para marcar sondas con digoxigenina fue mediante PCR convencional (condiciones en la Tabla II), en un volumen final de 20 µl por cada sonda. La reacción contenía Buffer 1X (Invitrogen), 1.5 mM de MgCl₂, dNTPs (3 mM de dATP, dCTP, dGTP, 2 mM de dTTP y 1 mM de DIG -11-dUTP marca Roche), 0.5 µM de cada iniciador, 1 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen), 1 µl de la sonda purificada respectiva como se indica en el punto anterior. El marcaje se confirmó mediante el cambio en la migración en un gel de agarosa al 1.2%, en comparación con productos similares sin DIG (ver capítulo 3).

2.5 Southern Blot.

Para digerir el ADN genómico se usaron las enzimas de restricción Eco RI y Pvu II (Promega). Las reacciones de restricción se realizaron individualmente en un volumen final de 400 µl, con 300 U de enzima y 30 µg de ADN. Las reacciones se incubaron a 37° C toda la noche. Los fragmentos, producto de las enzimas de restricción, se precipitación en 0.1 volumen de 4 M acetato de amonio y 2.5 volúmenes de etanol al 100%. Se incubó el conjunto a -20 C por 30 minutos, seguido de centrifugación a 14000 RPM por 20 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el etanol, dejando el pellet

secar al ambiente por 10 minutos. Finalmente el pellet se resuspendió en 20 μ l de agua ultrapura.

A continuación, el producto de restricción purificado se resolvió en un gel de agarosa al 1%, a 60 V por 7 h. La técnica de Southern blot comprende 4 fases que son transferencia, pre-hibridación, hibridación y post-hibridación. En la primera fase, el gel se lo sumergió en una solución de HCl (0.25M) por 10 minutos para depurar el ADN, seguido de dos incubaciones en solución 1 (0.2 N de NaOH y 0.5 M de NaCl) por 10 minutos para desnaturalizar las cadenas de ADN. Después se realizó dos incubaciones en solución 2 (1 M de NaCl y 0.5 M de Tris-Cl, pH 8.0) por 10 minutos para neutralizar el pH del gel, y una incubación final en solución de transferencia SSC 20X (0.75 M de NaCl y 75 mM de citrato de sodio). El gel sometido a este procedimiento fue utilizado para ensamblar el aparato de transferencia (Fig. 3). En breve, la solución de transferencia migra por capilaridad, desde el reservorio hasta el material absorbente en la parte superior del aparato, entrando en contacto sucesivamente con el gel y la membrana. Durante este proceso, el ADN depositado en el gel es transferido a la membrana de nylon con carga eléctrica positiva. El tiempo de transferencia fue de 72 horas. Luego se secó la membrana en un horno a 120°C por 30 minutos para fijar el ADN. Para la fase de pre-hibridación se humedeció la membrana en una solución SSC 2X, después se colocó la membrana dentro de una funda plástica con 45 ml de solución de hibridación Church Gilber (1 mM de EDTA, 0.5 M de NaHPO₄,

7% de SDS, pH final 7.2) precalentada a 65 °C. El conjunto se incubó a 65 °C por 3 horas. Para la fase de hibridación, las sondas 1, 2 y 3 se calentaron a 95 °C por 5 minutos antes de agregarlas a 45 ml de solución de hibridación fresca, precalentada a 65 °C. Esta solución se agregó a la membrana y se incubó a 65 °C toda al noche. En la fase de post-hibridación se lavó la membrana en solución SSC 2X por 10 minutos, seguida por 6 lavados de 10 minutos cada uno con solución A (SSC 0.2X+SDS 0.1%) y, de igual manera, con solución B (SSC 0.1X+SDS 0.1%). Después se lavó la membrana dos veces con solución SSC 0.1X por 5 minutos. La membrana se equilibró en una solución TBS (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 2.7 mM de KCl y 137 mM de NaCl), antes de bloquearla en TBS con 5% de leche por 45 min., a temperatura ambiente. Se enjuagó brevemente la membrana en TBS, y se incubó con 150 U de anticuerpo anti-Digoxigenin marcado con fosfatasa alcalina (Fab fragments, Roche), en TBS con 5% de leche por 45 min a temperatura ambiente. Luego se lavó la membrana varias veces en TBS, seguida de buffer B (50 mM de Tris-Cl pH 9.0, 1 mM de MgCl₂ y 100 mM de NaCl). Finalmente se añadió la solución de revelado con sustrato de fosfatasa alcalina precipitante (BM Purple precipitating alkaline phosphatase substrate, Roche) sobre la membrana por 3 horas, sin agitación. Para detener la reacción se agregó 50 ml de solución TBS con 1mM de EDTA.

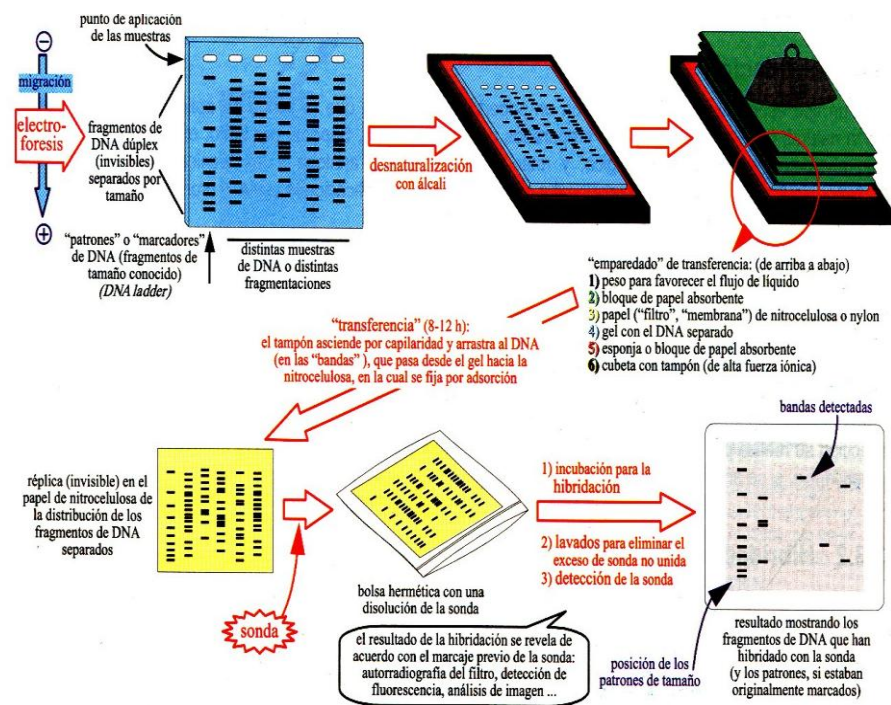


Figura 3. Esquema de la técnica de Southern blot. Se describe desde la electroforesis de las muestras de ADN digeridas con enzimas de restricción hasta el revelado de la membrana de nylon.

2.6 PCR Inversa

La figura 4 esquematiza el principio y métodos generales utilizados para la PCR inversa.

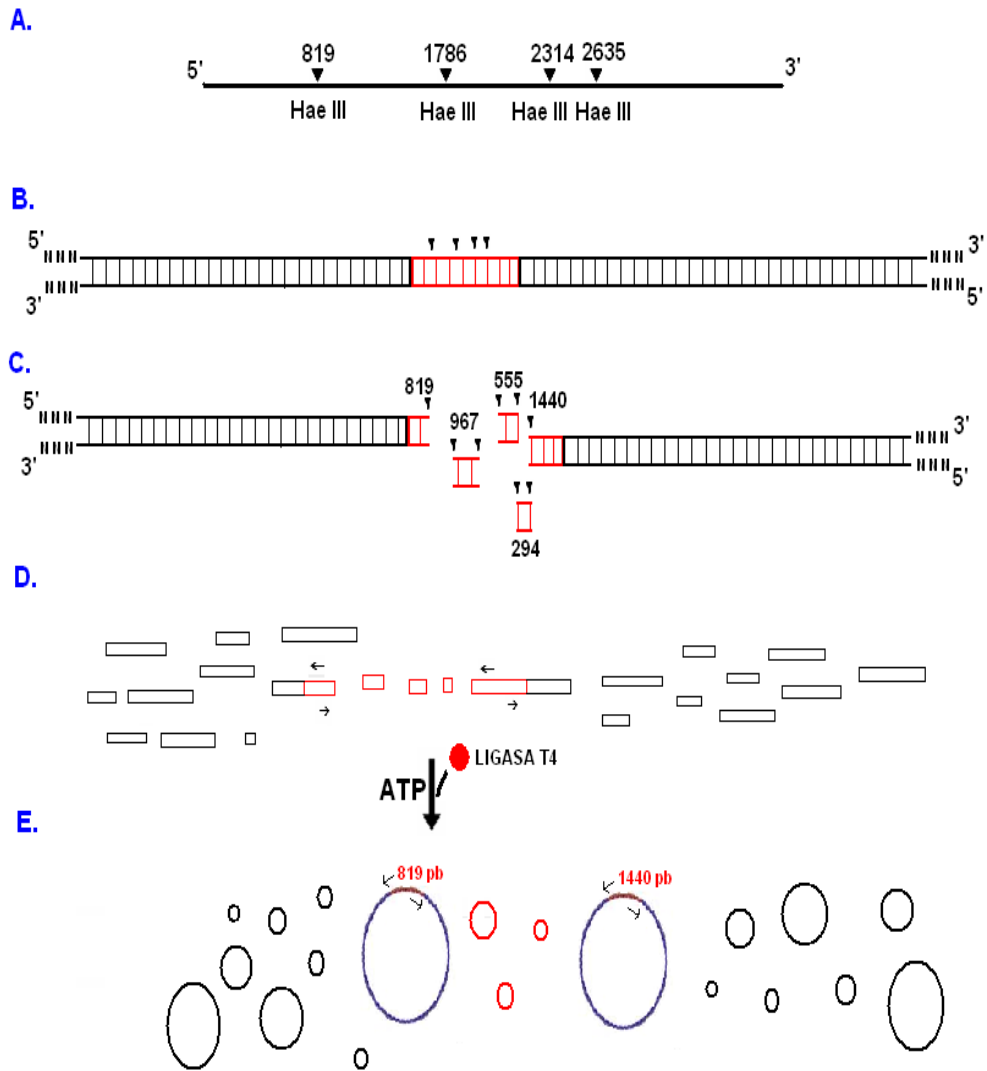


Figura 4. Esquema General de la PCR Inversa. **A.** Posición de los cuatro sitios de restricción para Hae III a lo largo del ADN de simple cadena del IHNV, la estructura de simple cadena no permite la digestión por parte de las enzimas de restricción. **B.** Genoma del IHNV integrado en el genoma del camarón, **C.** Debido a la conjugación las secuencias del IHNV forman doble cadena permitiendo el corte de ADN por las enzimas de restricción. **D.** La digestión genera varios fragmentos de diferente tamaño. Se realiza la PCR usando iniciadores forward y reverse en sentido opuesto, estos iniciadores hibridan en los fragmentos de los extremos del IHNV donde se prevee haya nucleótidos del camarón. **E.** Proceso de ligación catalizada por la enzima ligasa T4. La reacción de ligación circulariza los fragmentos generando varios círculos, y permitiendo la amplificación de fragmentos de ADN del hospedero flanqueados por ADN viral.

Se tomaron las muestras de ADN que presentaron señal en Southern blot para someterlas a una reacción de digestión con 40 U de Hae III (Promega), utilizando 4 µg de ADN en un volumen final de 40 µl. La reacción se incubó a 37° C por 2 horas. Como control negativo, no se agregó Hae III.

Luego de la digestión se procedió a precipitar el ADN digerido y el control negativo con 4 µl de acetato de amonio 4M y 110 µl de etanol al 100% helado. Se mezcló por breves segundos en el vórtex y se incubaron los tubos en el congelador por 30 minutos. Después de centrifugar los tubos a máxima velocidad por 15 minutos a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y se secó el pellet a temperatura ambiente por 10 minutos. Finalmente se agregó 40 µl de agua ultrapura para obtener una concentración final de ADN digerido de 100 ng/µl.

Los fragmentos de ADN purificados se ligaron con T4-ligasa (Promega). Para la reacción de ligación se utilizó tres cantidades de sustrato (ADN digerido), ya que la cantidad de sustrato es un factor limitante para favorecer la formación de círculos intramoleculares y debe ser determinada empíricamente para cada muestra. Las concentraciones probadas fueron 10 ng, 50 ng o 100 ng de ADN digerido en diferentes tubos. Las ligaciones se realizaron en un volumen final de 100 µl, con 4 U de T4-ligasa e incubadas a 8 °C por 16 horas. Para el control negativo igualmente se agregaron los mismos reactivos pero sin la ligasa T4. Las reacciones de ligación se precipitaron con 10 µl de acetato de amonio 4M y 275 µl de etanol al 100%,

helo, e incubadas por 30 min en un congelador. Las reacciones se centrifugaron a máxima velocidad por 15 min., a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y el pellet se secó a temperatura ambiente por 10 minutos. Finalmente se resuspendió el pellet en 10 µl de agua ultrapura.

El ADN ligado se amplificó mediante PCR, utilizando 2 µl de buffer 10X (200mM de Tris-Cl pH 8.4, 500 mM de KCl), 0.6 µl de MgCl₂ 50 mM, 0.4 µl de dNTPs 20mM, 1 µl de primer forward 20 µM y 1 µl primer reverse 20 µM, 0.2 µl de *Taq* Polimerasa (5 U/ µl) y 2 µl de ADN ligado, en un volumen final de 20 µl.

El programa de amplificación consistió en 1 ciclo de 95° C por 3 minutos, 30 ciclos con un paso de 95 °C por 30 segundos, seguido un paso de hibridación de los iniciadores, un paso de extensión a 72° C por 1 min. y finalmente 1 ciclo final de extensión a 72 °C por 3 min.

CAPITULO 3

3. RESULTADOS

3.1 Implementación de protocolos para extracción de ADN genómico de *P. vannamei*

Para el presente estudio fue necesario ensayar algunos protocolos de extracción de ADN en diferentes tejidos del camarón como hepatopáncreas, epitelio, músculo, branquias y hemolinfa. El objetivo de estas pruebas fue implementar un protocolo que permita, a partir de tejidos de animales individuales, la obtención de ADN genómico de cantidad (*i.e.*, >30 µg) y calidad adecuada (*i.e.*, cociente $A_{260/280} > 1.7$ y sin fragmentación en geles de agarosa) para pruebas de Southern blot.

De todos los procedimientos evaluados (ver Tabla III), el protocolo que cumplió con los requerimientos arriba mencionados fue el Kit Easy DNA™ (Invitrogen), a partir de hemolinfa de reproductores. Tal como se indica en la Tabla 2, el Kit comercial utilizado resultó en un ADN de alta pureza, con un cociente $A_{260/280} > 1.8$, y un promedio de 51 µg de ADN por muestra (con rango de 36-89 µg). El ADN obtenido con el Kit Easy DNA™, al ser analizado en

geles de agarosa, mostró predominantemente una banda de alto peso molecular indicando la presencia de ADN genómico (Fig. 5).

Método	Tejido	Muestras evaluadas	Concentración de ADN promedio (ng/μl)	Cociente Absorbancia 260/280 Promedio	Degradación
CTAB	Hemolinfa	6	101.02	1.19	SI
	Branquias	6	117.32	1.09	SI
	Músculo	15	166.75	1.23	SI
	Hepatopáncreas	6	171.66	1.29	SI
	Epitelio	6	92.34	1.02	SI
Isotiocianato de guanidna	Hemolinfa	6	91.33	1.06	SI
	Branquias	6	102.53	1.23	SI
	Músculo	15	118.71	1.31	SI
	Hepatopáncreas	6	141.51	1.24	SI
	Epitelio	6	102.74	1.14	SI
Kit Pure Link™	Hemolinfa	6	97.0	1.33	SI
	Branquias	6	132.68	1.18	SI
	Músculo	15	127.85	1.12	SI
	Hepatopáncreas	6	112.15	1.17	SI
	Epitelio	6	30.14	1.09	SI
Kit Easy DNA™	Hemolinfa	25	508.9	1.99	NO
	Branquias	6	125.60	1.16	SI
	Músculo	6	289.32	1.35	SI
	Epitelio	6	107.97	1.10	SI

Tabla III: Cuadro comparativo entre los diferentes protocolos de extracción de ADN genómico en diferentes tejidos. La tabla muestra que el protocolo del kit Easy DNA de Invitrogen genera mayor cantidad y mejor calidad de ADN usando hemolinfa como muestra biológica.

En base a estos resultados, se decidió utilizar para las pruebas subsecuentes ADN genómico aislado con el kit Easy DNA™ de Invitrogen, a partir de hemolinfa de reproductores.

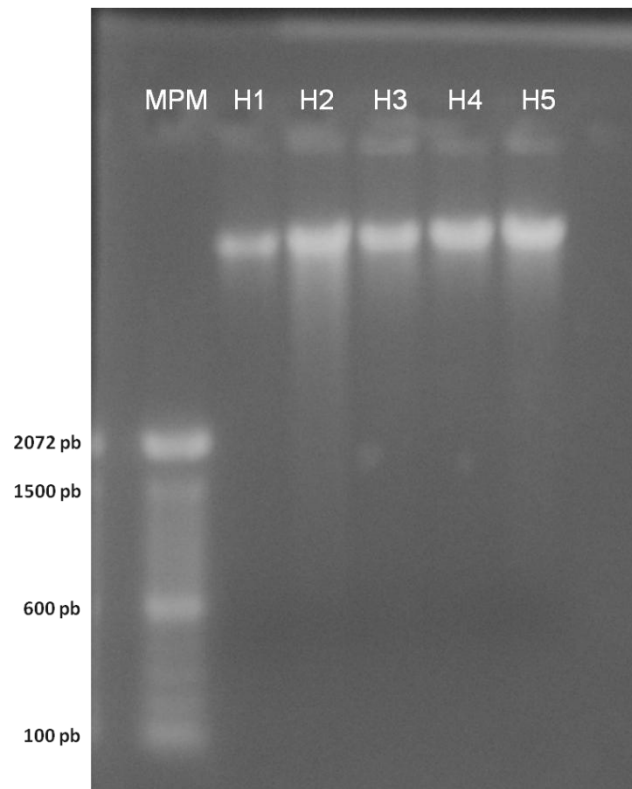


Figura 5. ADN genómico aislado de hemolinfa de reproductores con el kit Easy DNA™ y resuelto en agarosa al 0.8%. La cantidad de ADN en cada pocillo del H1 al H5 respectivamente es 1.4µg, 2.8 µg, 2.2 µg, 2.4 µg, 2.3 µg. MPM: Marcador de peso molecular.

3.2 Diseño De Sondas Para Southern Blot

Las sondas fueron generadas amplificando, por PCR, tres segmentos del genoma del IHHNV y utilizando como sustrato animales infectados con el virus. Las sondas de esta manera, generadas, se utilizaron para determinar la presencia de IHHNV en el ADN genómico de *P. vannamei* por Southern blot.

Las sondas fueron diseñadas a partir de la secuencia del genoma del IHNV depositadas en la base de datos de Gene Bank de NCBI (número de acceso AF218266).

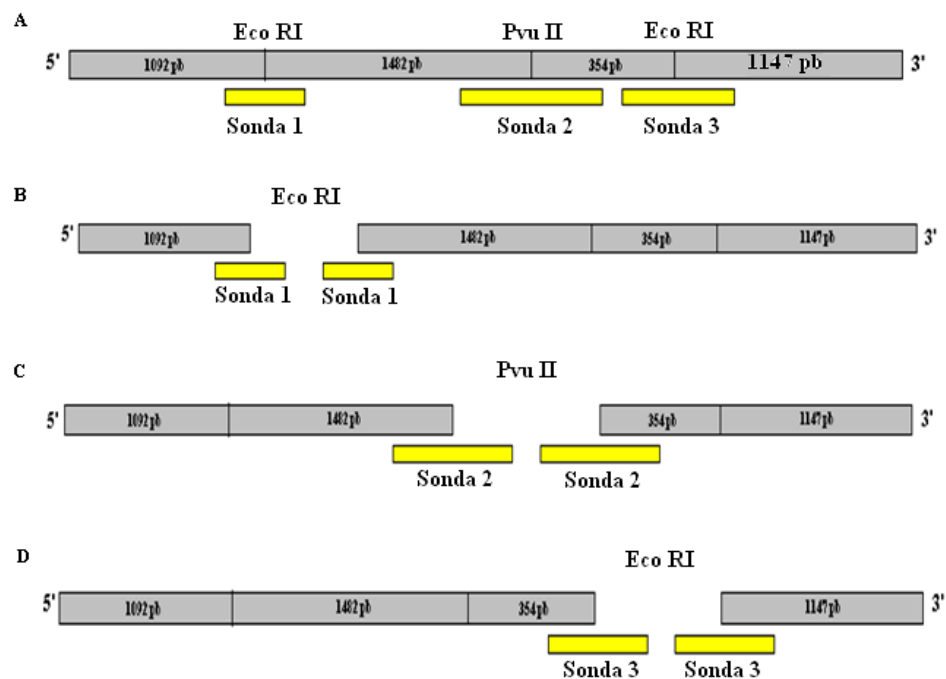


Figura 6. Esquema general de la hibridación de las sondas sobre el genoma del IHNV y los sitios de corte en el genoma del virus. **A.** Visualización general de la hibridación de las tres sondas, sobre el IHNV sin cortar con enzimas de restricción. **B.** La sonda 1 hibrida en dos productos del corte con la enzima Eco RI. **C.** La sonda 2 hibrida en dos productos del corte con la enzima Pvu II. **D.** La sonda 3 hibrida en dos productos del corte con la enzima Eco RI.

Los amplicones de ADN que se usaron como sondas, fueron secuenciados para confirmar que correspondían a las secuencias de ADN esperadas. Análisis de las secuencias obtenidas con BLAST (Basic Local

Alignment Search Tool, National Center for Biotechnology Information NCBI) confirmó la confiabilidad del protocolo de PCR implementado para generar sondas específicas para Southern blot (Anexo I). Posteriormente, las sondas 1, 2 y 3 fueron producidas a partir de los amplicones secuenciados.

Una vez validado el protocolo de PCR para la síntesis de las sondas, se realizaron pares de reacciones en presencia y ausencia de dUTP conjugado a digoxigenina-11 (DIG-11). La incorporación de DIG-11 al fragmento de ADN de interés permite su posterior detección, mediante anticuerpos específicos contra DIG-11 en los eventos de integración. Un método sencillo y eficaz para verificar el marcaje satisfactorio de la sonda (es decir, la incorporación de DIG-11) es la determinación de su peso molecular relativo, en comparación con el fragmento de ADN idéntico pero sin marcar. El peso adicional que DIG le confiere al fragmento de ADN marcado (1106.7 por cada molécula de DIG-11) es verificable mediante electroforesis en agarosa. Utilizando este método, se comprobó el marcaje de las sondas previo a cada prueba de Southern blot (ver Fig. 7).

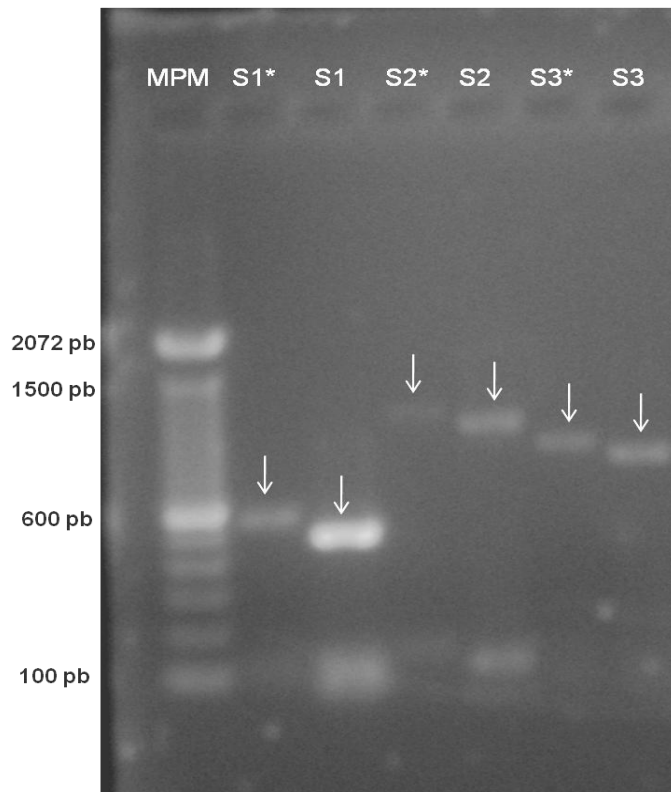


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de sondas con y sin DIG-11. MPM: Marcador de peso molecular. S1*, S2* y S3*: Sondas marcadas con DIG-11. S1, S2 y S3: Sondas sin digoxigenina. Se observa que las sondas con DIG poseen mayor tamaño que las sondas sin DIG evidenciando la exitosa incorporación de DIG-11.

3.3. Patrones De Hibridación Asociados Con IHNV: Southern Blot

La sensibilidad en la detección de fragmentos de ADN en Southern blot fue relativamente baja (comparado con PCR) y extremadamente dependiente de las condiciones experimentales utilizadas. Con el fin de establecer condiciones experimentales que permitan un adecuado poder de detección, se ensayaron variaciones a un protocolo genérico de Southern blot. Luego de algunas pruebas preliminares, se logró implementar un procedimiento capaz de detectar hasta 0.01 nanogramos (10 pg) de ADN blanco, utilizando como sonda (y blanco a la vez) un fragmento del genoma de IHNV amplificado por PCR de animales infectados (Fig. 8). Este límite

de sensibilidad en principio debería permitir la detección de eventos de integración únicos en el genoma del camarón cuando se analiza 10 μg de ADN en Southern blot (10 pg de blanco en 10 μg de ADN total, es decir un poder de detección de 1 en 1 millón (60). Este límite de detección es, sin embargo, inferior al óptimo posible en Southern blot utilizando otros métodos más sensibles (0.1-1 pg de blanco, usando sondas radioactivas con alta actividad específica y exposición autoradiográfica prolongada) (60).

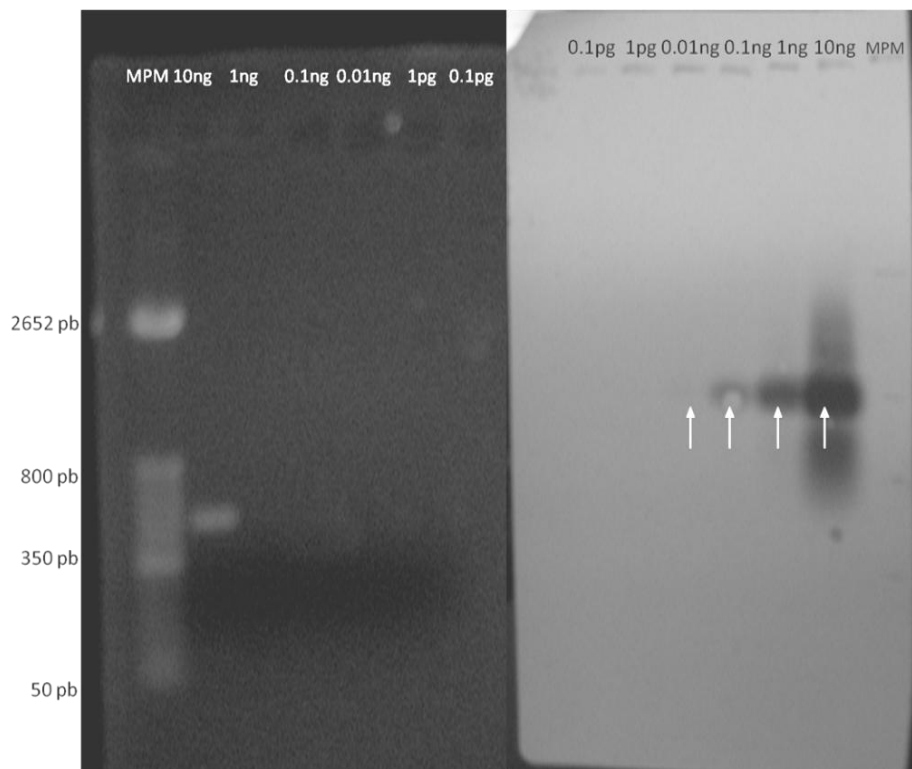


Figura 8. Sensibilidad del protocolo de Southern blot. **A:** Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de sonda 1 sin digoxigenina (463 nucleótidos) en cantidades desde 10 nanogramos a 0.0001 nanogramos, donde se observa con claridad la sonda en una cantidad de 10 nanogramos. **B:** Membrana de Nylon luego del Southern blot donde se observa la sensibilidad desde 10 nanogramos hasta 0.01 nanogramos.

Una vez establecido un protocolo de Southern blot moderadamente sensible, se procedió a obtener ADN genómico a partir de hemolinfa de animales asintomáticos portadores de IHHNV. Para el efecto, se monitorearon un total de 25 *P. vannamei* (la mayoría hembras) para determinar la presencia de ADN viral. La prueba de diagnóstico se basó en un ensayo de PCR para la amplificación de un fragmento de 350 pb del genoma de IHHNV. Un ejemplo de los resultados obtenidos durante este monitoreo se muestra en la Fig. 9. En total, de los 25 animales analizados con el protocolo descrito en el capítulo 2, 23 fueron positivos para el virus. Todos los animales analizados carecieron de signos aparentes de enfermedad. Estos resultados son consistentes con estudios anteriores, que han encontrado prevalencias extremadamente altas de portadores asintomáticos en poblaciones domesticadas de *P. vannamei* en Ecuador (29, 62)

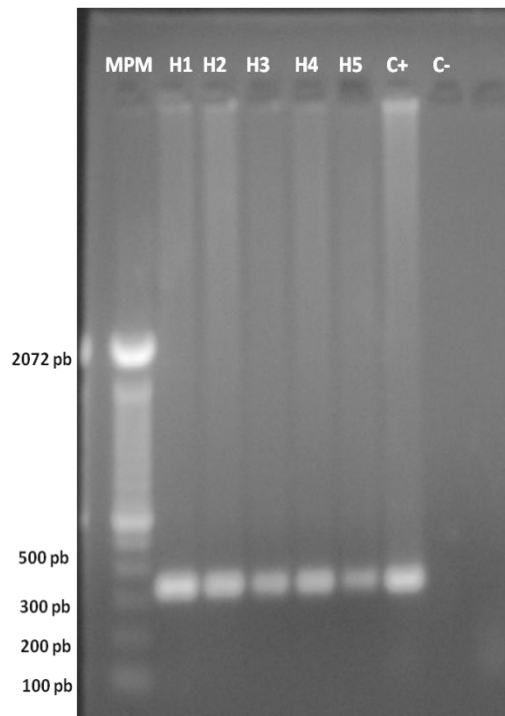


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de diagnóstico de IHHNV en muestras de ADN de reproductores. Los iniciadores IHHNV-5 (forward) IHHNV-6 (reverse) producen amplicones de 350 pares de bases. C+ proviene de un animal confirmado positivo para IHHNV, C- representa una reacción sin ADN.

A partir de estos resultados, se procedió a escoger las muestras de mayor intensidad en los amplicones de IHHNV (asumiendo que corresponden a animales con mayor carga viral). De este grupo se escogieron las muestras para las cuales se logró obtener la mayor cantidad de ADN genómico total utilizando el protocolo de extracción descrito anteriormente. El objetivo de aplicar este proceso en la selección de las muestras a ser analizadas por Southern blot fue incrementar la probabilidad de detectar

eventos de integración, al utilizar la mayor cantidad posible de ADN blanco. Las muestras escogidas fueron sometidas a tres reacciones de digestión con endonucleasas de restricción: i) digestión simple con Eco RI, ii) digestión simple con Pvu II, y iii) doble digestión con Eco RI y Pvu II. A manera de control, se sometió una muestra de ADN a una digestión con la enzima Bam HI, con el fin de evaluar la especificidad de los patrones de hibridación obtenidos en las reacciones con Eco RI y Pvu II (el sitio de restricción para Bam HI no está presente en el genoma del IHHNV publicado).

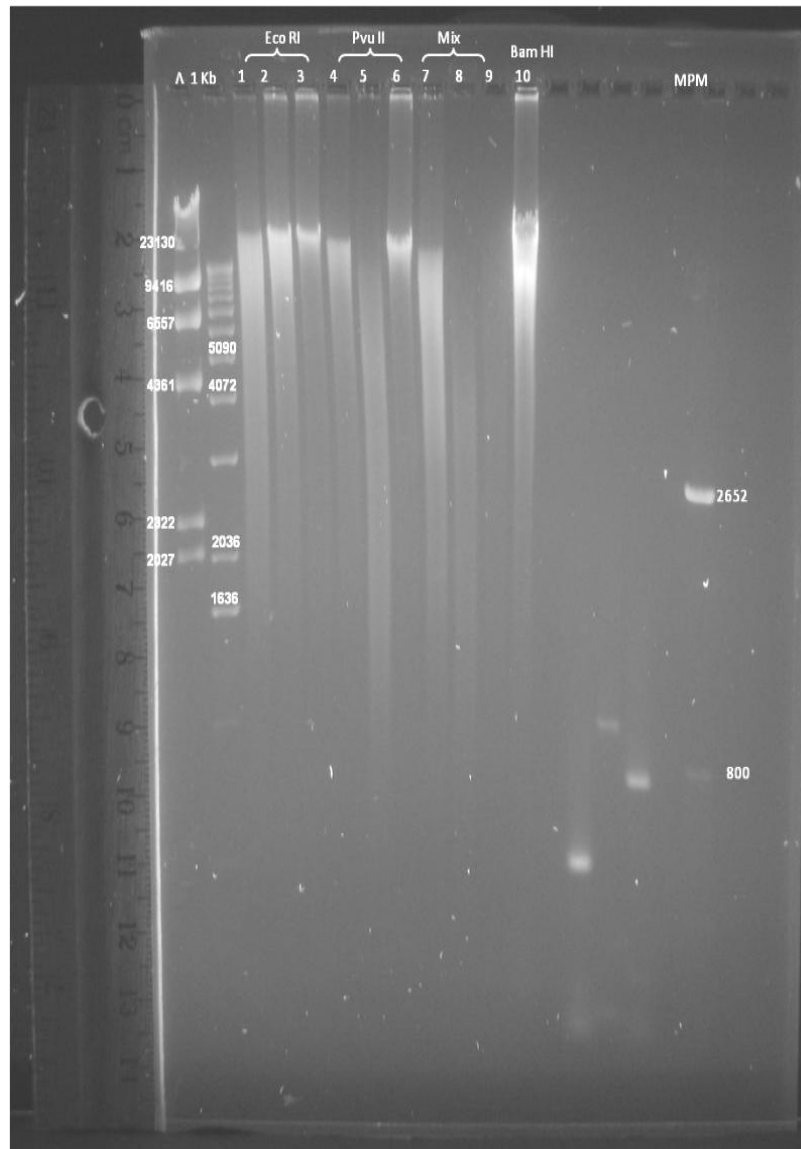


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de ADN genómico digerido con las enzimas Eco RI, Pvu II y Bam HI. Hay una cantidad de 30 µg en cada pozo. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa al 1% por 7 horas a 60 voltios, el gel fue teñido con bromuro de etidio y fotografiado bajo luz UV. MPM= Marcador de peso molecular casero, Λ =ADN del fago lambda digerido con Hind III, 1 Kb= Marcador de peso molecular comercial de 1 kb, Mix=Doble digestión con Eco RI y Pvu II. Las tallas de los fragmentos de los marcadores de peso están indicadas. La regla al costado del gel permite establecer la relación entre distancia migrada (cm) y peso molecular (kb).

Para lograr una buena separación de la multitud de fragmentos heterogéneos que generan las enzimas de restricción, se realizó la electroforesis del ADN digerido por 7 horas a 60 voltios (Fig. 10). El ADN digerido y separado por electroforesis fue fotografiado junto a una referencia de distancia (regla) para la posterior estimación del tamaño (en pb) de los fragmentos de ADN hibridados.

Las enzimas de restricción Eco RI y Pvu II son endonucleasas de tipo II que reconocen sitios de restricción (palíndromes) en ADN de doble cadena. El IHHNV tiene ADN de simple cadena, por lo tanto las enzimas de restricción no van a digerir el ADN viral libre (no integrado) a pesar de que éste posea sitios de restricción para ambas enzimas como lo muestra la Figura 11.

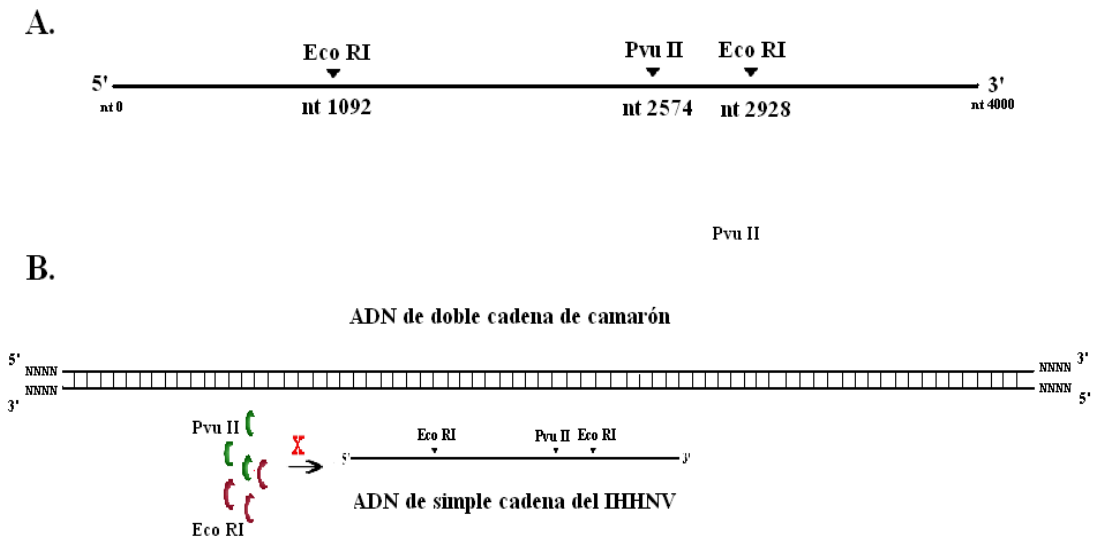


Figura 11. Esquema de acción de las enzimas de restricción sobre el ADN de simple cadena del virus y ADN de doble cadena del camarón. **A)** Esquema de la posición de los sitios de restricción (Eco RI y Pvu II) a lo largo del genoma del IHHNV, el virus posee dos sitios de corte para Eco RI y un sitio de corte para Pvu II. **B)** Esquema de dos tipos de ADN: de doble cadena (genoma de camarón) y de simple cadena (genoma del IHHNV) en donde las enzimas de restricción solo reconocen sitios de restricción de ADN de doble cadena, por lo tanto las enzimas no digieren el ADN del virus.

En caso de existir integración el ADN del virus sería de doble cadena, permitiendo así que las enzimas de restricción corten el genoma viral y puedan ser analizados por Southern blot como lo muestran las Figuras 12, 13 y 14.

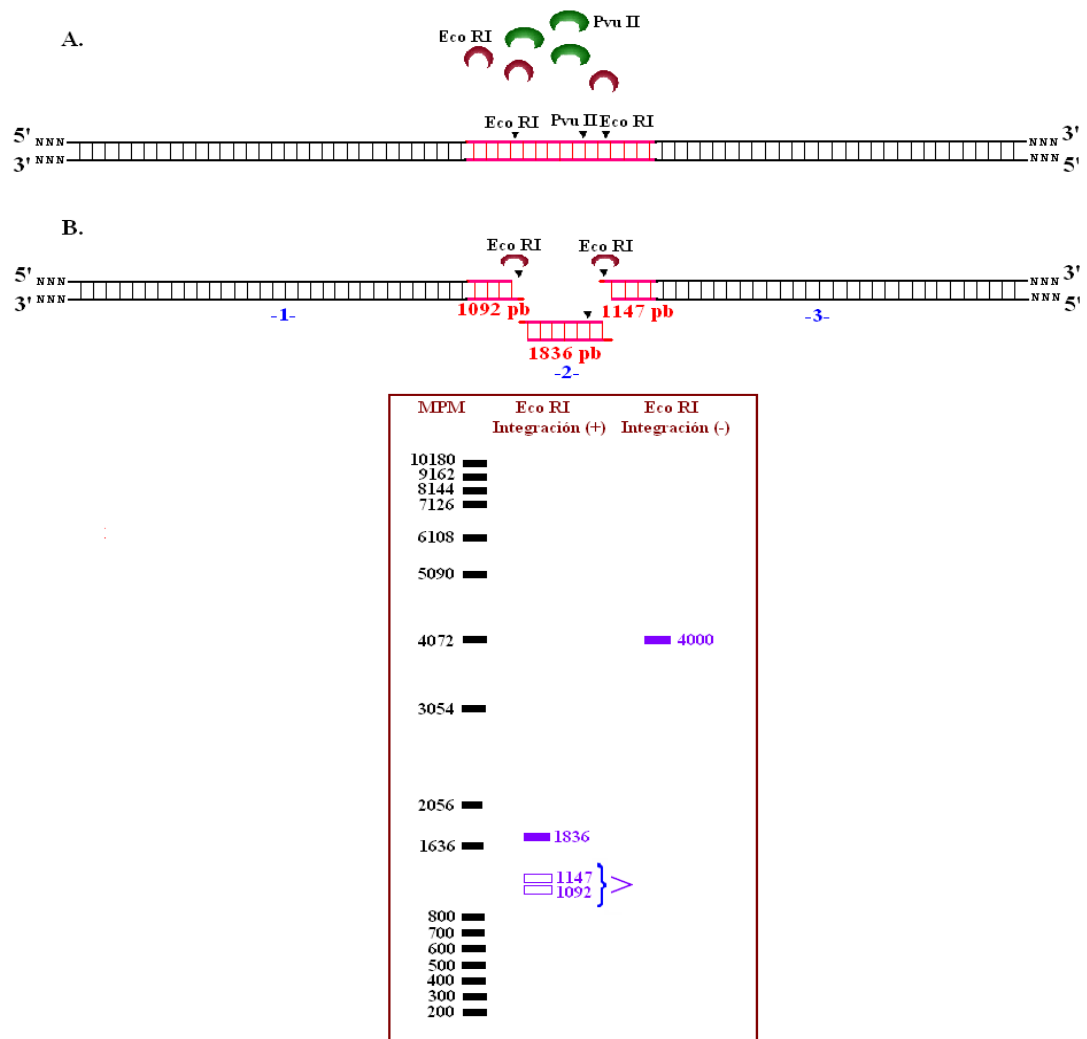


Figura 12. Esquema general de integración viral, digestión con Eco RI y Southern blot. **A.** El genoma del IHHNV está integrado en el genoma del camarón, por ello tiene doble cadena y las enzimas de restricción pueden digerir tanto el ADN viral como el ADN del camarón. En este esquema se muestra la acción de las dos enzimas de restricción utilizadas, Eco RI y Pvu II. **B.** Acción de la enzima Eco RI en ambos sitios de restricción en el ADN viral integrado. Esta digestión genera tres fragmentos, de los cuales los extremos tienen nucleótidos adicionales debido a la integración con el genoma del camarón: el primer fragmento debe tener un tamaño mayor a 1092 pb debido a la presencia de nucleótidos del genoma del camarón, el segundo fragmento 1836 pb y el tercer fragmento de tamaño mayor a 1147 pb por la presencia de los nucleótidos del camarón. **C.** Esquema del Southern blot con 3 carriles: MPM=Marcador de Peso Molecular, ADN viral Integrado y ADN viral no integrado (libre). En el ADN viral integrado se espera observar tres bandas de diferente tamaño mencionadas en **B.** En el ADN viral no integrado solo se espera ver una banda correspondiente al virus libre ~4000 nt.

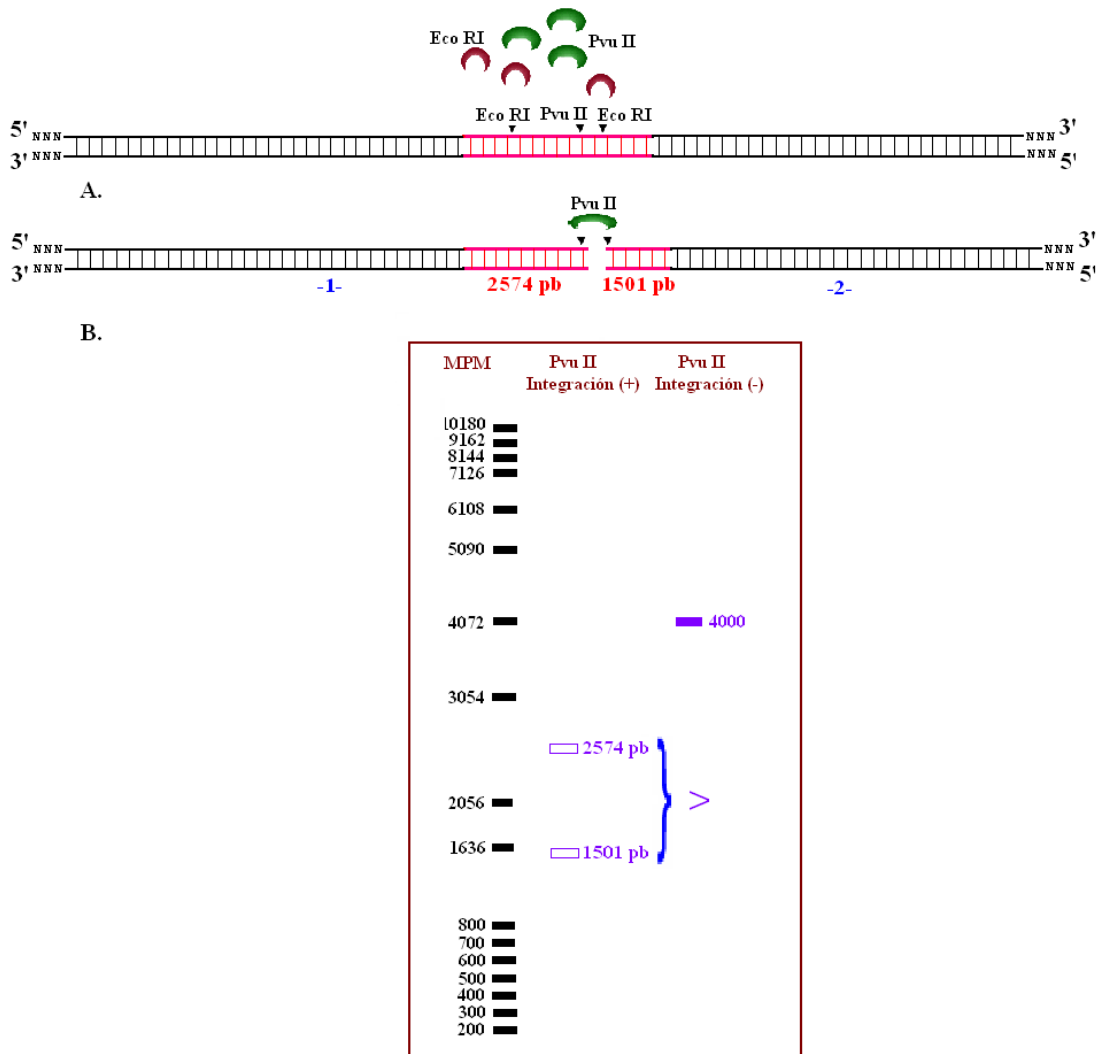


Figura 13. Esquema general de Integración viral, digestión con Pvu II y Southern blot. **A.** Acción de la enzima Pvu II sobre el ADN viral integrado, esta digestión genera dos fragmentos cuyos flancos poseen nucleótidos del genoma del camarón que le otorgan mayor peso en ambos fragmentos, así se predice que el tamaño de los fragmentos deben ser mayor a 2574 pb y 1501 pb respectivamente. **B.** Esquema del Southern blot con 3 carriles: MPM= Marcador de Peso Molecular, ADN viral Integrado y ADN viral no integrado (libre). En el ADN viral integrado se espera observar dos bandas de diferente tamaño mencionadas en A. El signo ">" significa que las bandas deben ser de mayor tamaño a las que se muestran (2574 pb y 1501 pb). En el ADN viral no integrado solo se espera ver una banda correspondiente al virus libre ~4000 nt.

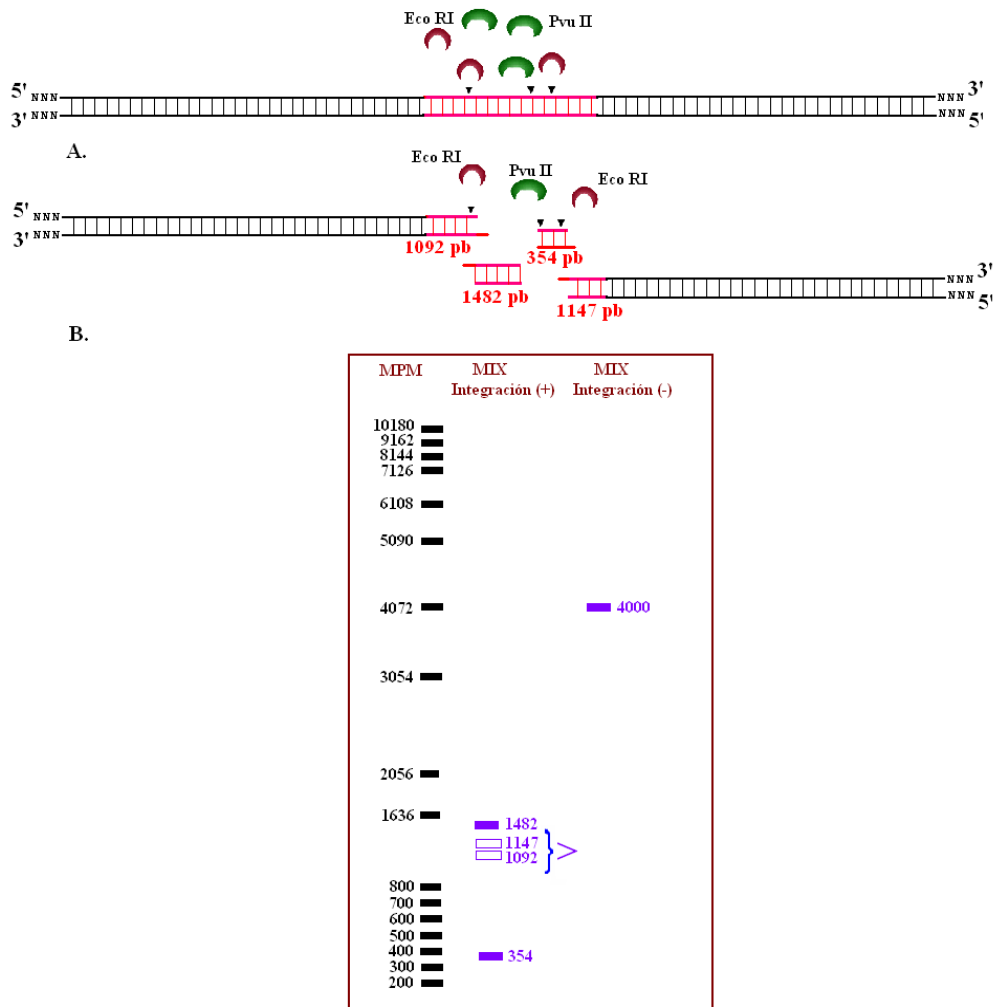
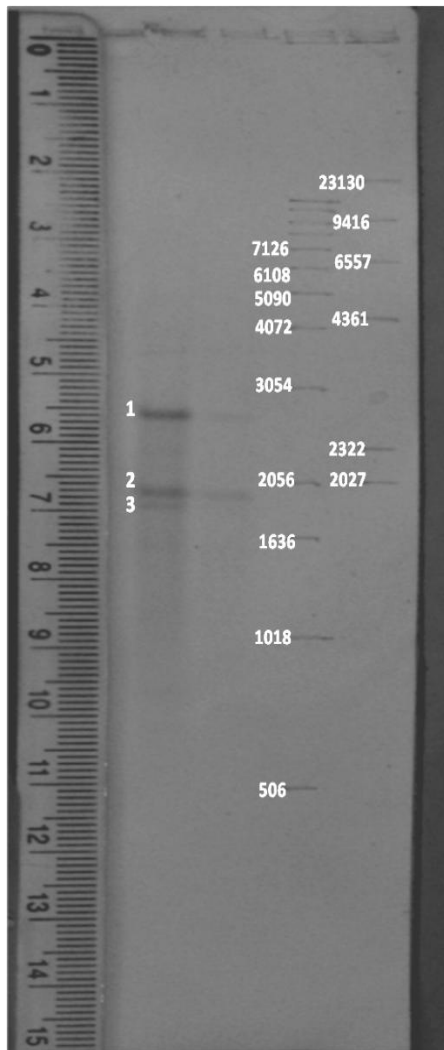


Figura 14. Esquema general de Integración viral, digestión con Eco RI y Pvu II y Southern blot. **A.** Acción sobre el ADN viral integrado de las dos enzimas Eco RI y Pvu II en una misma reacción (MIX), esta digestión genera cuatro fragmentos. Los fragmentos de los extremos del genoma viral poseen nucleótidos del genoma del camarón que les otorga mayor peso, entonces se puede predecir que el tamaño de los fragmentos de los flancos deben ser mayor a 1147 pb y 1092 pb. Los otros dos fragmentos (1482 pb y 354 pb) no poseen secuencias del camarón ya que no son fragmentos que no están en los flancos del genoma viral. **B.** Esquema del Southern blot en 3 carriles: MPM= Marcador de Peso Molecular, ADN viral Integrado y ADN viral no integrado (libre). En el ADN viral integrado se espera observar cuatro bandas de diferente tamaño mencionadas en A. El signo ">" significa que las bandas deben ser de mayor tamaño a las que se muestran (1147 pb y 1092 pb). En el ADN viral no integrado solo se espera ver una banda correspondiente al virus libre ~4000 nt.

Uno de los potenciales problemas en la interpretación de patrones de hibridación en Southern blot es la evaluación de la especificidad de dichos patrones. En los estudios aquí presentados se intentó facilitar esta interpretación analizando, en la medida de lo posible, ADN genómico proveniente de la misma muestra (*i.e.* del mismo animal) tanto con Eco RI como con Pvu II y/o con digestión simultánea con ambas enzimas. Sin embargo, en muchas ocasiones esto no fue posible, debido a que era necesario obtener al menos 30 µg de ADN total a partir de la hemolinfa de un solo animal, y para muchas muestras la cantidad de ADN obtenida estuvo por debajo de este requerimiento. Se decidió considerar un patrón de hibridación como confiable, cuando la misma muestra diera un patrón diferente al ser digerida con una endonucleasa diferente. La lógica para justificar este control de calidad es la siguiente: los patrones de hibridación observados al separar electroforéticamente el mismo ADN cortado con enzimas distintas deben ser distintos, ya que los fragmentos generados son específicos para cada enzima. La Figura 15 muestra el patrón de hibridación único que se observó al cabo de analizar el ADN de 6 animales, ya sea con Eco RI, Pvu II, o con ambas enzimas. El ADN de la mayoría de animales no reveló patrón alguno de hibridación, a pesar de que los animales fueron positivos para IHHNV, en el diagnóstico por PCR. Este bajo poder de detección enfatiza la necesidad de incrementar la sensibilidad del protocolo de Southern blot en estudios futuros de integración de IHHNV. El resultado

más revelador fue que el patrón de hibridación mostrado en la Figura 15 se observó en muestras de ADN de diferentes individuos, independientemente de la enzima usada para digerir el ADN previo a la electroforesis. Esto sugiere que los diferentes fragmentos de ADN viral detectados no corresponden a ADN de doble cadena digerido con las enzimas de restricción utilizadas. La interpretación más simple de este resultado es que el ADN libre de IHHNV simple cadena, al migrar en un gel de agarosa bajo condiciones no desnaturizantes, forma estructuras secundarias que migran en un patrón que no corresponde al esperado para ADN lineal de 4 Kb. Consistente con esta explicación, el ADN de IHHNV tiene el potencial de formar estructuras secundarias extensas, en parte debido a las múltiples regiones con secuencia repetitiva, incluidos los elementos terminales repetitivos que son importantes para la replicación del ADN viral (13). Un ejemplo de este fenómeno es presentado en el Anexo II, que muestra estructuras secundarias predecibles para el ADN monocatenario libre de IHHNV utilizando un algoritmo especializado (programa RNAfold web server, página web <http://rna.tbi.univie.ac.at/>). Futuros experimentos deberán utilizar condiciones desnaturizantes durante el Southern blot para corroborar esta hipótesis.



# Banda	Tamaño Aproximado (X= banda observada)
1	2322<X<3054
2	1636<X<2056
3	1636<X<2056

Figura 15. Patrón de hibridación único observado en ADN de animales portadores de IHNV. Los carriles 1 y 2 corresponden a ADN genómico de dos individuos digerido con Eco RI. A la derecha de los patrones de hibridación se muestran las posiciones de las bandas correspondientes a los dos marcadores de peso molecular utilizados. Una mezcla de las 3 sondas descritas en la sección 3.2 fue utilizada en esta prueba.

3.4 Resultados de PCR Inversa.

La Figura 4 esquematiza el principio utilizado en PCR inversa para la identificación de sitios de integración viral. En breve, la digestión del ADN genómico con una enzima de corte frecuente (en este caso Hae III) genera

una multitud de fragmentos de ADN relativamente pequeños. En presencia de la enzima ligasa, que genera enlaces fosfodiéster en ADN bicatenario, los extremos de estos pequeños fragmentos son ligados, resultando en la formación de moléculas circulares. A partir de iniciadores específicos para secuencias virales, y tomando ventaja del carácter circular de estas moléculas, es posible amplificar fragmentos de ADN en donde una región originada en el hospedero es flanqueada por secuencias virales (ver Fig. 4).

El Anexo III contiene la secuencia del genoma de IHHNV mostrando los sitios Hae III, la estructura de los círculos esperados como resultado de la ligación, y los iniciadores usados en las pruebas de PCR inversa, cuya secuencia también se muestra en la tabla IV.

Nombre del Iniciador	Secuencia 5'-3' del Iniciador
IHHNV-C11-FW	gacgtaaccgcttctgcat
IHHNV-C12-FW	atatcgctacgctactgcca
IHHNV-C21-FW	tcacgcaccatgtactggac
IHHNV-C22-FW	acataccagctaccaggca
IHHNV-C11-REV	ctcgtcagtagaaactggg
IHHNV-C12-REV	cggactaggtattgattgcc
4 REV-2780	tggatctttccttgggcttg
IHHNV-6	gccaatgttacgtcggcttc

Tabla IV. Denominaciones y secuencias de los iniciadores usados en la PCR inversa.

Para incrementar las posibilidades de amplificación de fragmentos que representen eventos de integración, se combinaron los iniciadores, y cada combinación debía generar un amplicón con un tamaño mínimo, el cual es

posible predecir en base a la secuencia de nucleótidos del genoma del virus
(ver Tabla V)

Círculo	Combinación de iniciadores	Tamaño mínimo del Amplicón (pb)
C1	1) IHHNV-C11-FW / IHHNV-C11-REV	565
	2) IHHNV-C11-FW / IHHNV-C12-REV	650
	4) IHHNV-C12-FW / IHHNV-C12-REV	417
C2	5) IHHNV-C21-FW / IHHNV-4REV-2780	548
	6) IHHNV-C21-FW / IHHNV-6	1020

Tabla V. Combinación de iniciadores y tamaño de los fragmentos de los productos de cada combinación. Para cada fragmento ligado de los extremos del virus (círculo 1 y 2) hay combinaciones de iniciadores forward y reverse. Cada combinación genera un amplicón diferente cuyo tamaño debería ser mayor a los señalados en la tabla debido a la presencia de nucleótidos de camarón.

Luego de realizar la amplificación con todas las combinaciones, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2% para verificar los productos de amplificación.

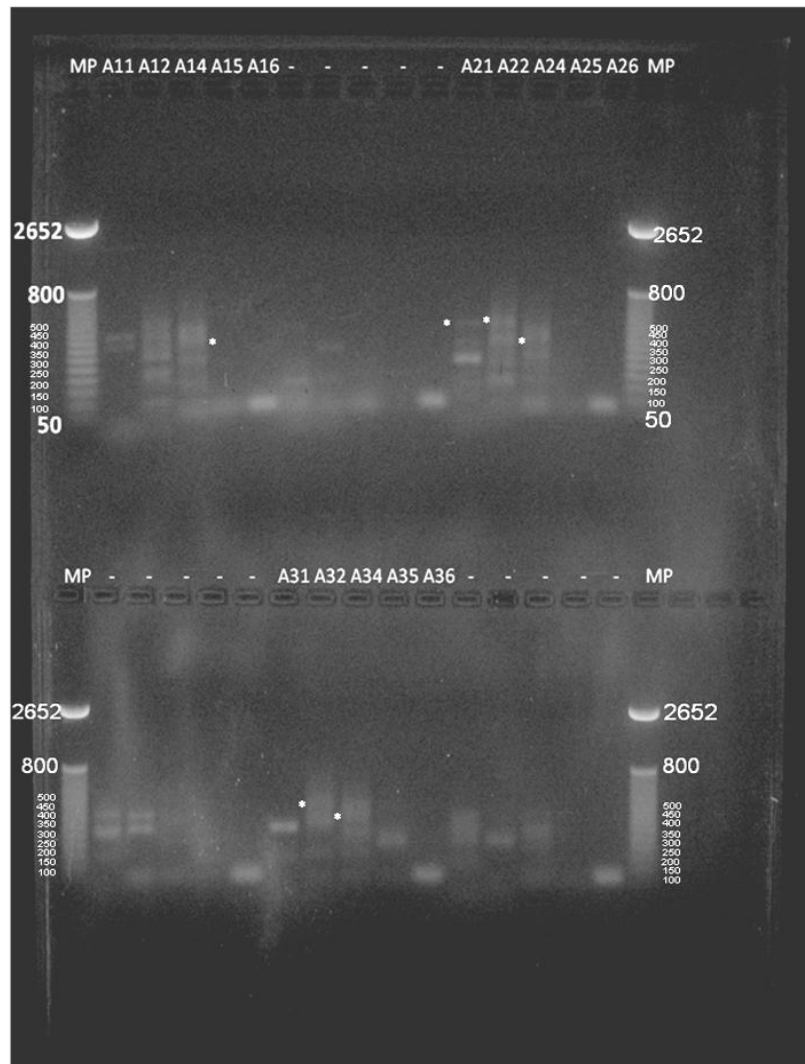


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR inversa con las diferentes combinaciones de iniciadores. Cada pocillo tiene una denominación con la letra A y dos dígitos, la letra A significa una muestra de ADN, el primer dígito (1, 2 y 3) significa la cantidad de ADN utilizado en la ligación: 10 ng, 50 ng y 100 ng respectivamente; y el segundo dígito (1, 2, 4, 5 y 6) representan las combinaciones de iniciadores mostradas en la tabla #4. Esta PCR fue realizada en una muestra de ADN que presentó señal en Southern blot. En cada pocillo se observan amplicones de diferente tamaño. Los asteriscos (*) en A14, A21, A22, A24, A31 y A32 indican bandas mayores a las del tamaño mínimo esperado. Sin embargo los controles negativos (ADN sin ligar) presentan falsos positivos.

En la Figura 16, se muestran los múltiples productos de amplificación obtenidos durante la prueba PCR inversa. Algunos de los productos observados son, en base a su tamaño, potencialmente representativos de eventos de integración. Sin embargo, no fue posible durante este estudio obtener, de forma consistente, productos de amplificación esperados para caracterizarlos por secuenciación. No obstante, estas pruebas preliminares fueron útiles para el diseño de iniciadores y la implementación de los procedimientos básicos para realizar, en estudios futuros, pruebas más extensas en base a PCR inversa. Este método claramente tiene como ventaja un tiempo más corto de ejecución, así como un costo relativamente más bajo, en comparación con el Southern blot.

El conjunto de resultados presentados en esta tesis no son suficientes para aceptar o negar la posibilidad de integración de IHNV en *P. vannamei*. Sin embargo, en especial utilizando Southern blot, los resultados son sugestivos de la no integración del ADN viral en animales asintomáticos de la población estudiada.

CAPITULO 4

4. DISCUSIÓN

En la producción de camarón se han implementado métodos para la mitigación de enfermedades que afectan negativamente la producción. Una de las estrategias propuestas ha sido la generación de animales libres de patógenos específicos, tales como el IHHNV, que bajo ciertas condiciones ha sido asociado con el síndrome de la deformidad y el enanismo. Al momento el método más usado para el diagnóstico del IHHNV es por PCR, técnica que por su sensibilidad y relativo bajo costo ha sido aceptada a nivel comercial. Prevalencias cercanas al 100% (en base a PCR) pueden ser observadas en poblaciones domesticadas sin signos aparentes de enfermedad (29) (BIOGEMAR S.A. resultados no publicados). Esto indica la existencia de animales portadores asintomáticos, y la importancia de condiciones ambientales en el desarrollo de patologías asociadas con el IHHNV. Una posible explicación para estas observaciones sería la capacidad del IHHNV para co-existir con el hospedero, posiblemente promoviendo estados de latencia. Un mecanismo que podría estar asociado con latencia es la

integración del genoma viral en el genoma del hospedero. En *P. monodon* la existencia de ADN de IHNV integrado ha sido documentada (6). Considerando estos antecedentes, se planteó la hipótesis de un fenómeno similar (integración viral) en *P. vannamei*, lo cual podría explicar la alta prevalencia de ADN viral en ausencia de enfermedad.

Para demostrar la presencia o ausencia de secuencias del virus integrado en el genoma de *P. vannamei* se utilizó la técnica de Southern blot. Se observó un único patrón (tres bandas) de hibridación en todas las muestras positivas en pruebas de Southern blot (el primero mayor a 2322 pb, el segundo se aproxima a 2000 pb y el tercero mayor a 1636 pb). En principio, este patrón de restricción podría ser indicativo de ADN viral integrado. Sin embargo, dicho patrón no varió en relación con las enzimas de restricción utilizadas, lo cual sugiere que se trata de ADN resistente a estas endonucleasas (e.g. ADN monocatenario). La explicación más sencilla para estos resultados es que corresponden a diferentes estructuras secundarias de la cadena de ADN del virus. En base a estos resultados, durante esta investigación no se encontró evidencia de integración de ADN viral en la población de *P. vannamei* evaluada. Futuras investigaciones serán necesarias para confirmar estas conclusiones. En particular, muchos más individuos y poblaciones deberán ser evaluados, y un ensayo de PCR inversa similar a las pruebas preliminares presentadas en esta Tesis, podría ser utilizado.

Es importante determinar si existe integración de ADN de IHNV en *P. vannamei* para comprender mejor varios aspectos de su ciclo de vida, su epidemiología, y el desarrollo de métodos de diagnóstico más informativos.

Un ejemplo concreto sería la modificación del diagnóstico para el IHNV basado en PCR, mediante el diseño de iniciadores capaces de discriminar el ADN viral libre del ADN viral integrado. Además en caso de integración sería importante saber en qué locus del genoma del hospedero se encuentran las secuencias del virus, con el fin de investigar las posibles consecuencias de la integración sobre la fisiología del mismo. Desde el punto de vista epidemiológico, la integración viral podría contribuir a explicar los resultados de distribución y aparente transmisión del virus en base a pruebas de PCR. .

CONCLUSIONES

1.- Mediante las pruebas de PCR en reproductores domesticados, se confirmaron resultados obtenidos en investigaciones anteriores, que describen una alta prevalencia de IHHNV en animales en cautiverio, aunque en su gran mayoría estos animales no presentan signos aparentes de enfermedad.

2.- No se encontró una clara evidencia de secuencias del IHHNV integradas en el genoma del camarón mediante la técnica del Southern blot.

RECOMENDACIONES

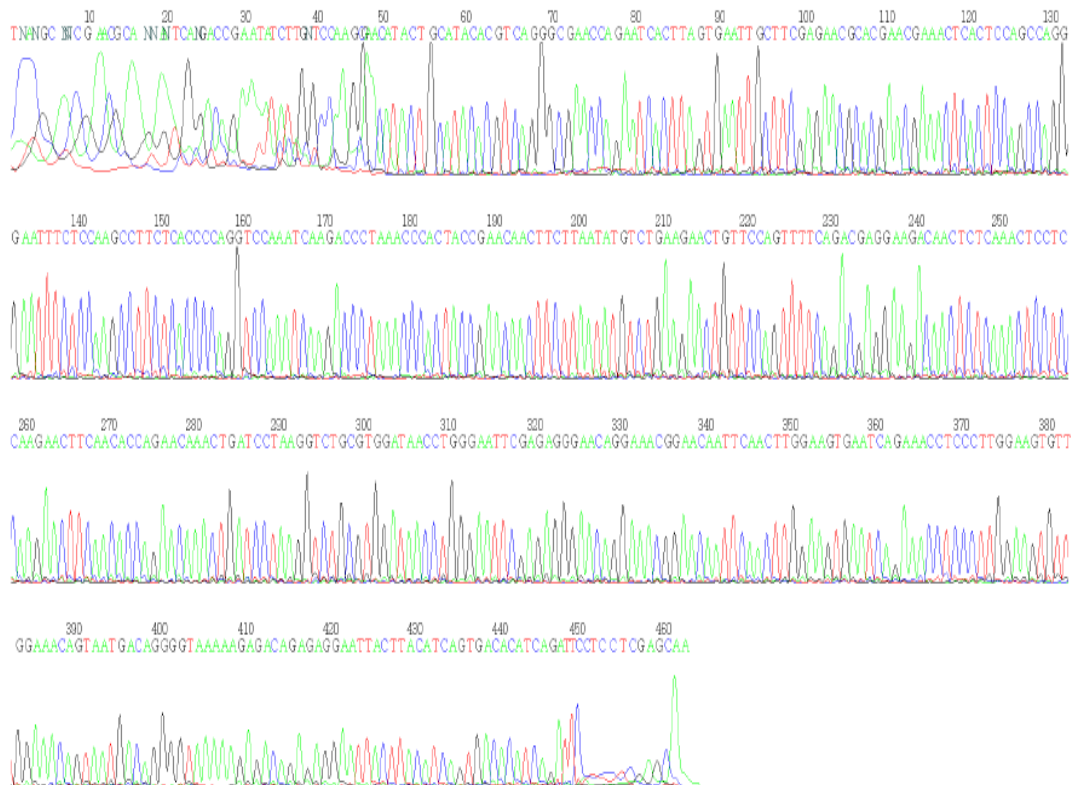
- 1.- En base a la sensibilidad relativamente baja de la técnica de Southern blot utilizada, sería útil implementar modificaciones al protocolo tales como utilizar una solución de transferencia alcalina, solución de hibridación diferente (puede ser comercial).
- 2.- Es recomendable la inclusión de la técnica de PCR inversa en estudios futuros de búsqueda de sitios de integración de ADN de IHHNV en *P. vannamei*.

ANEXOS

ANEXO 1

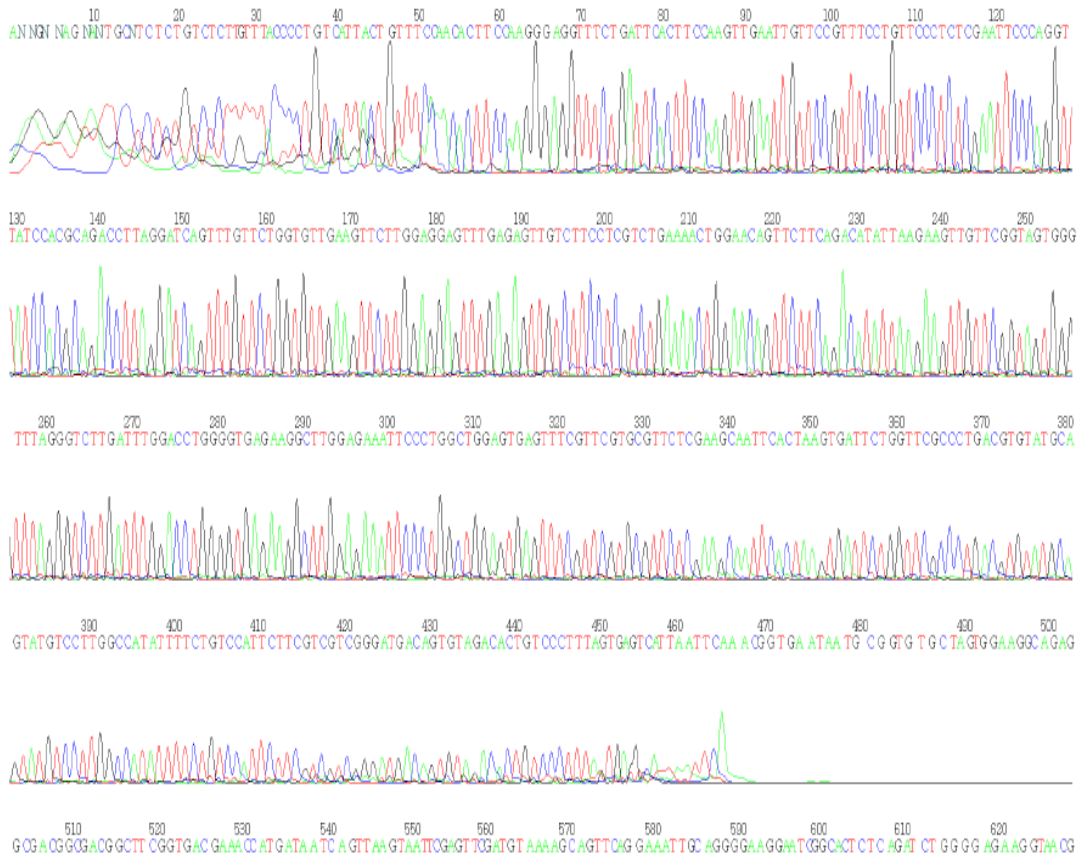
Resultado del secuenciador. Sonda 1 (secuenciado en sentido derecho)

File: S11-S1-FW.ab1 Run Ended: 2009/4/1 13:25:36 Signal G:3877 A:6277 C:6120 T:5887
Sample: S11_S1-FW Lane: 15 Base spacing: 16.88686 463 bases in 5477 scans Page 1 of 1



Resultado del secuenciador. Sonda 1 (secuenciado en sentido inverso)

File: S12-S1-RV.ab1 Run Ended: 2009/4/1 13:25:36 Signal G:2937 A:2984 C:3340 T:5597
Sample: S12_S1-RV Lane: 13 Base spacing: 16.91996 684 bases in 8183 scans Page 1 of 2



Significado de colores en las siguientes secuencias:

ROJO: Nucleótidos detectados por el secuenciador en sentido forward.

AZUL: Nucleótidos detectados por el secuenciador en sentido reverse.

VERDE: Consenso (ensamblaje de secuencias) entre los nucleótidos detectados en sentido forward y reverse.

NEGRO: Nucleótidos no detectados por el secuenciador.

NUCLEOTIDOS DE LA SONDA 1 SECUENCIADOS EN SENTIDO FW

ggacagtgtctacactgtcatcccgacgacgaagaatggacagaaaatatggccaagga**catact
gcatacacgtcagggcgaaccagaatcacttagtgaattgcttcgagaacgcacgaacgaaactcactcc
agccaggaatttctccaagccttctaccccagggtccaaatcaagaccctaaaccactaccgaacaac
ttctaatatgtctgaagaactgttccagtttcagacgaggaagacaactctcaaactcctccaagaactca
acaccagaacaaactgatcctaaggctgctggataacctgggaattcgagaggggaacaggaacgg
aacaattcaactggaagtgaatcagaaacctcccttgggaagtgttgaaacagtaatgacaggggtaa
aagagacagagaggaattacttacatcagtgacacatcagattcct**

NUCLEOTIDOS DE LA SONDA 1 SECUENCIADOS EN SENTIDO REV

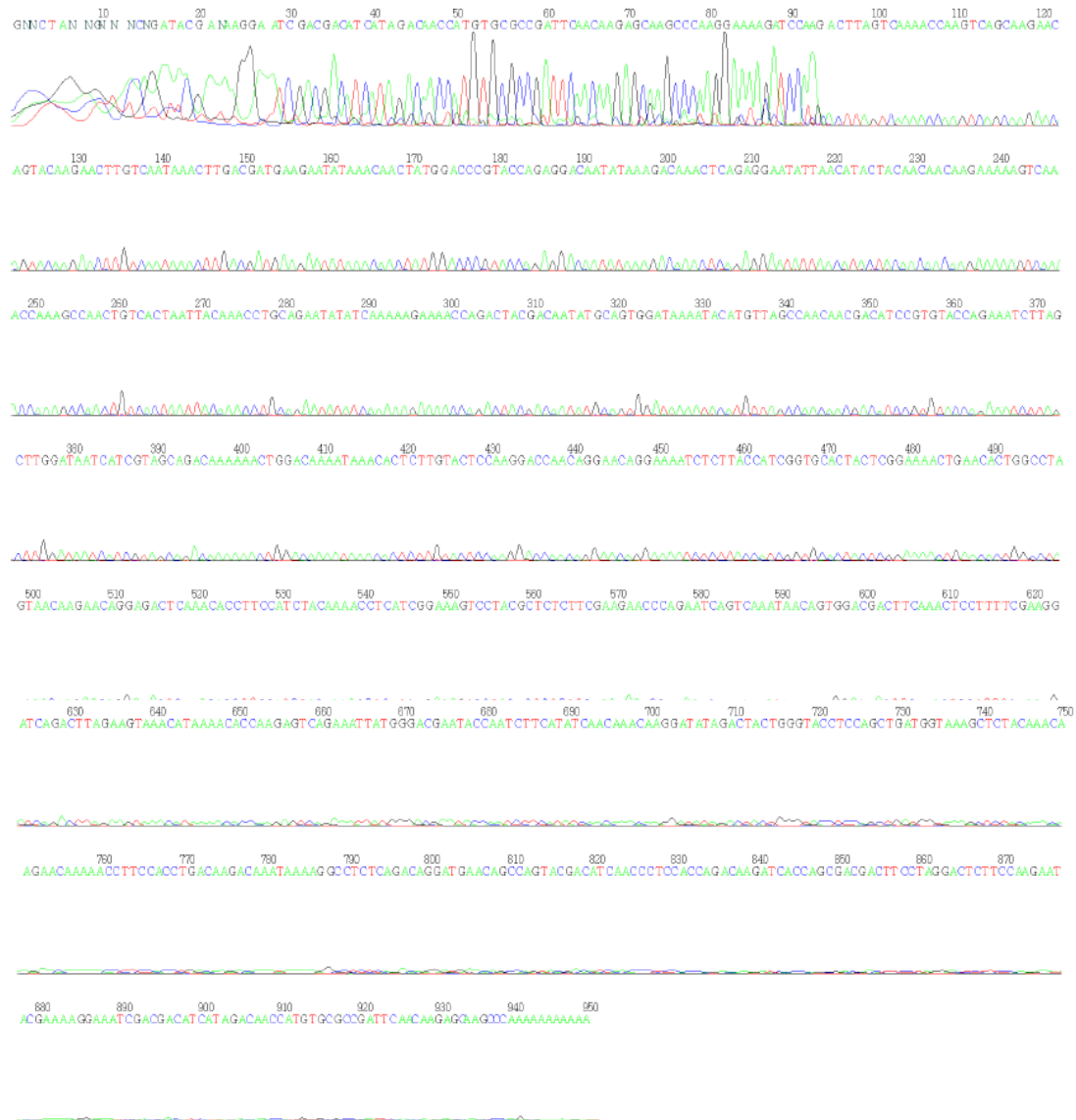
ggacagtgtctacactgtcatcccgacgacgaagaatggacagaaaatatggccaaggacatactgcat
acacgtcagggcgaaccagaatcacttagtgaattgcttcgagaacgcacgaacgaaactcactccagc
caggaatttctccaagccttctaccccagggtccaaatcaagaccctaaaccactaccgaacaacttctt
aatatgtctgaagaactgttccagtttcagacgaggaagacaactctcaaactcctccaagaactcaaca
ccagaacaaactgatcctaaggctgctggataacctgggaattcgagaggggaacaggaacgggaac
aattcaactggaagtgaatcagaaacctcccttgggaagtgttgaaacagtaatgacaggggtaaaaag
agacagagaggaattacttacatcagtgacacatcagattcct

**EL RESULTADO DE LA SECUENCIACION UNIENDO LOS DOS
SENTIDOS (CONSENSO ENTRE FW y REV)**

ggacagtgtctacactgtcatcccgacgacgaagaatggacagaaaatatggccaaggacatactgcat
acacgtcagggcgaaccagaatcacttagtgaattgcttcgagaacgcacgaacgaaactcactccagc
caggaatttctccaagccttctaccccagggtccaaatcaagaccctaaaccactaccgaacaacttctt
aatatgtctgaagaactgttccagtttcagacgaggaagacaactctcaaactcctccaagaactcaaca
ccagaacaaactgatcctaaggctgctggataacctgggaattcgagaggggaacaggaacgggaac
aattcaactggaagtgaatcagaaacctcccttgggaagtgttgaaacagtaatgacaggggtaaaaag
agacagagaggaattacttacatcagtgacacatcagattcct

Resultado del secuenciador. Sonda 2 (secuenciado en sentido Forward)

File: S21-S2-FW.ab1 Run Ended: 2009/4/1 13:25:36 Signal G:1728 A:2801 C:1864 T:1724
Sample: S21_S2-FW Lane: 11 Base spacing: 16.722786 950 bases in 11337 scans Page 1 of 2



Resultado del secuenciador. Sonda 2 (secuenciado en sentido Reversa)

File: S22-S2-RV.ab1 Run Ended: 2009/4/1 13:25:36 Signal G:989 A:792 C:647 T:1213
Sample: S22_S2-RV Lane: 9 Base spacing: 17.100597 950 bases in 11186 scans Page 1 of 2



Significado de colores en las siguientes secuencias:

ROJO: Nucleótidos detectados por el secuenciador en sentido forward.

AZUL: Nucleótidos detectados por el secuenciador en sentido reverse.

VERDE: Consenso (ensamblaje de secuencias) entre los nucleótidos detectados en sentido forward y reverse.

NEGRO: Nucleótidos no detectados por el secuenciador.

NUCLEOTIDOS DE LA SONDA 2 SECUENCIADOS EN SENTIDO FW

ccaacaatacagaagagacgaagacgcagtagacggaccatgtccatataatgactactacaaga
gaagaccgctgaagaaaaacctaagaaaacagtcgagaatataatgactacc**tccaacacttagt**
caaaaccaagtcagcaagaacagtacaagaacttgcaataaactgacgatgaagaatataaacaact
atggaccgtagcagaggacaataaagacaaactcagaggaatattaacatactacaacaaga
aaaagtcaaaccaagccaactgtcactaattacaacctgcagaatatacaaaaagaaaaccagact
acgacaatatacagtgataaaatacatgttagccaacaacgacatccgtgtaccagaaatcttagctgg
ataatcatcgtagcagacaaaaaactggacaaaataaacactctgtactccaaggaccaacaggaaca
ggaaaatcttaccatcgggtgcactactcggaaaactgaacactggcctagtaacaagaacaggagact
caaacaccttccatctacaaaacctcatcggaaagtctacgctctctcgaagaaccagaatcagtc
ataacagtgacgacttcaaaccttttcgaaggatcagacttagaagtaaacataaaacaccaagagtc
agaaattatgggacgaataccaatcttcatatcaacaacaagatatagactactgggtacctc**cagctg**
atggtaaagctctacaaacaagaacaaaaaccttccacctgacaagacaaataaaaggcctctcagac
aggatgaacagccagtagcagatcaaccctccaccagacaagatcaccagcagcacttctaggact
ctccaagaatacgaaggaaatcgacgacatcatagacaacatgtgcgccgattcaacaagagca
agcccaaggaaaagatcca

NUCLEOTIDOS DE LA SONDA 2 SECUENCIADOS EN SENTIDO REV

ccaacaatacagaagagacgaagacgcagtagacggaccatgtccatataatgactactacaaga
gaagaccgctgaagaaaaacctaagaaaacagtcgagaatataatgactacc**tccaacacttag**
tcaaaaccaagtcagcaagaacagtacaagaacttgcaataaactgacgatgaagaatataaa
caactatggaccgtagcagaggacaataaagacaaactcagaggaatattaacatactaca
caacaagaaaaagtcaaaccaagccaactgtcactaattacaacctgcagaatatacaaaa
gaaaaccagactacgacaatatacagtgataaaatacatgttagccaacaacgacatccgtgta
ccagaatcttagcttgataatcatcgtagcagacaaaaaactggacaaaataaacactcttgta
tccaaggaccaacaggaacaggaaaatcttaccatcgggtgcactactcggaaaactgaacactggcct
agtaacaagaacaggagactcaaacacttccatctacaaaacctcatcggaaagtcctacgctctctcg
aagaaccagaatcagtcataaacagtgacgacttcaaaccttttcgaaggatcagacttagaagta
aacataaaacaccaagagtcagaaattatgggacgaataccaatcttcatatcaacaacaagata
gactactgggtacctc**cagctgatggtaaagctctacaaacaagaacaaaaaccttccacctgacaagac**
aaataaaaggcctctcagacaggtgaacagccagtagcagatcaaccctccaccagacaagatcacc
agcagcacttctaggactctccaagaatacgaaggaaatcgacgacatcatagacaac**ccatgtg**
cgccgattcaacaagagcaagccaaggaaaagatcca

UNIENDO LOS DOS SENTIDOS (CONSENSO ENTRE FW Y REV)

**ccaacaatacagaagagacgaagacgcagtagacggaccatgtccatatatgactactacaaga
gaagaccgcgctgaagaaaaacctaagaaaacagtcagaatatgactacc**tccaacacttagt
caaaaccaagtcagcaagaacagtacaagaactgtcaataaactgacgatgaagaatataaacaact
atggaccgtaccagaggacaatataaagacaaaactcagaggaatattaacatactacaacaacaaga
aaaagtcaaaccaagccaactgtcactaattacaacctgcagaatataccaaaagaaaaccagact
acgacaatatgcagtgataaaatacatgttagccaacaacgacatccgtgtaccagaaatcttagctgg
ataatcatcgtagcagacaaaaaactggacaaaataaacactcttgactccaaggaccaacaggaaca
ggaaaatctcttaccatcggtgcactactcgaaaactgaacactggcctagtaacaagaacaggagact
caaacaccttccatctacaaaacctcatcgaaaagtcctacgctctctcgaagaaccagaatcagtcaa
ataacagtgagcacttcaaactcctttcgaaggatcagacttagaagtaaacataaaacaccaagagtc
agaaattatgggacgaataccaatcttcatatcaacaaacaaagatatagactactgggtacctccagctg
atggtaaagctctacaaacaagaacaaaaaccttccacctgacaagacaaataaaaggcctctcagac
aggatgaacagccagtacgacatcaaccctccaccagacaagatcaccagcgacgacttctaggact
ctccaagaatacgaaaaggaaatcgacgacatcatagacaacatgtgcccgatcaacaagagca
agcccaag**ggaaaagatcca**

Resultado del secuenciador. Sonda 3 (secuenciado en sentido Forward)



Resultado del secuenciador. Sonda 3 (secuenciado en sentido Reverse)

File: S32-S3-RV.ab1 Run Ended: 2009/4/1 13:25:36 Signal G:2077 A:1897 C:1828 T:3224
Sample: S32_S3-RV Lane: 5 Base spacing: 17.345707 772 bases in 9128 scans Page 1 of 2



Significado de colores en las siguientes secuencias:

ROJO: Nucleótidos detectados por el secuenciador en sentido forward.

AZUL: Nucleótidos detectados por el secuenciador en sentido reverse.

VERDE: Consenso (ensamblaje de secuencias) entre los nucleótidos detectados en sentido forward y reverse.

NEGRO: Nucleótidos no detectados por el secuenciador.

NUCLEOTIDOS DE LA SONDA 3 SECUENCIADOS EN SENTIDO FW

agagtcagaaattatgggacgaataccaatcttcatatcaacaacaagatatagactactgggta
cctccagctgatggtaaagctctacaacaagaacaaaacctccacctgacaagacaaataaaagg
cctctcagacaggatgaacagccagtagcatcaaccctccaccagacaagatcaccagcgacgact
cctaggactctccaagaatacgaaggaatcgacgacatcatagacaacctgtgcccattca
caagagcaagccaaggaaaagatccaggaggatgcacataatgaagacgaagaacacgccgaa
ggatcaagtggaccagaccacacagatgtctacaattcaatactggagactcaatacatattacttcaa
acaagaagatacttgaattcgacgctccaatgatggaaacttcgacggaaaaatttatactgcctcc
actacattggatgaacttatactctatggctaaagagcagcgacagttcagcaacagaaacacaacgat
ataagatggtaaaatcaatgatgaagacctacggatggaaagtacataaagcaggcgtagtgactc
gatggtacccttatgaaagacttaaagatcaggaggcacatcatttgagactctcacatttacagacac
cccatattagaaatatttaaggatactactggactacataatcaactatcaactaaggaagccgacgtaac
attggc

NUCLEOTIDOS DE LA SONDA 3 SECUENCIADOS EN SENTIDO REV

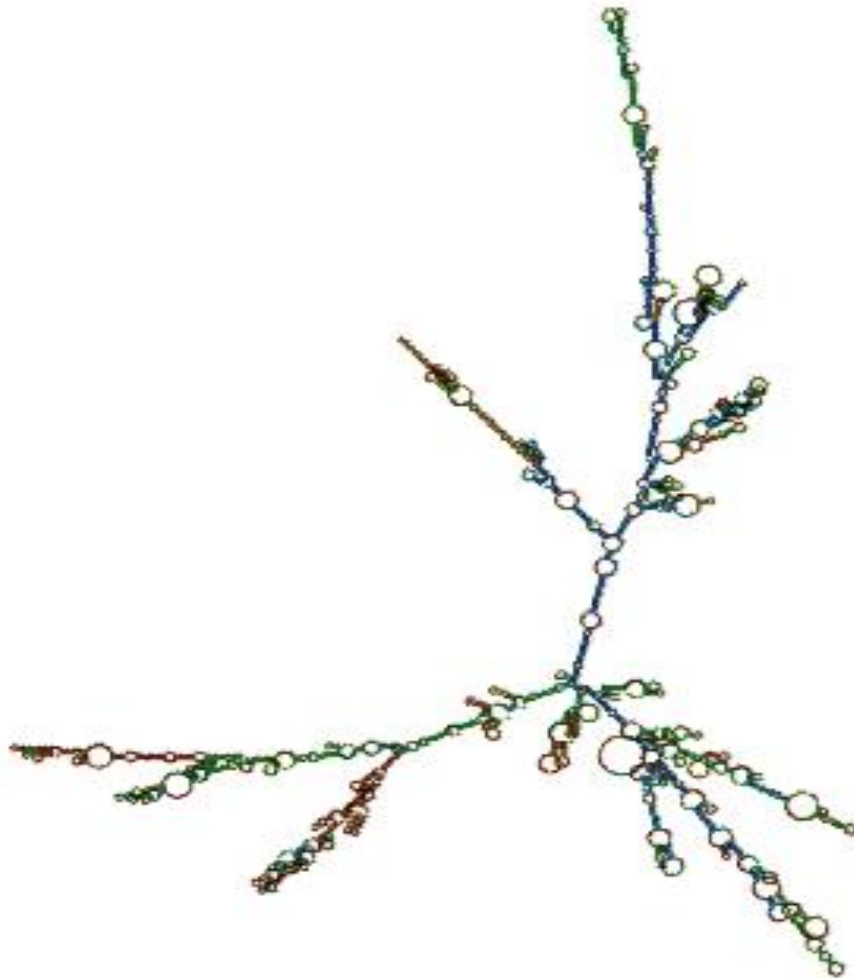
Agagtcagaaattatgggacgaataccaatcttcatatcaacaacaagatatagactactgggtacctc
cagctgatggtaaagctctacaacaagaacaaaacctccacctgacaagacaaataaaaggcctct
cagacaggatgaacagccagtagcatcaaccctccaccagacaagatcaccagcgacgacttcta
ggactctccaagaatacgaaggaatcgacgacatcatagacaacctgtgcccattcaacaag
agcaagccaaggaaaagatccaggaggatgcacataatgaagacgaagaacacgccgaaggat
caagtggaccagaccacacagatgtctacaattcaatactggagactcaatacatattacttcaaaca
agaagatacttgaattcgacgctccaatgatggaaacttcgacggaaaaatttatactgcctcccacta
cattggatgaacttatactctatggctaaagagcagcgacagttcagcaacagaaacacaacgatataa
gatgtaaaatcaatgatgaagacctacggatggaaagtacataaagcaggcgtagtgactcgtg
gtacccttatgaaagacttaaagatcaggaggcacatcatttgagactctcacatttacagacaccca
tatttagaaatatttaaggatactactggactacataatcaactatcaactaaggaagccgacgtaacat
tggc

UNIENDO LOS DOS SENTIDOS (CONSENSO ENTRE FW Y REV)

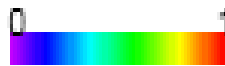
agagtcagaaattatgggacgaataccaatcttcatatcaacaaacaaagatatagactactgggtacctc
cagctgatggtaaagctctacaaacaagaacaaaaacctccacctgacaagacaaataaaaggcctct
cagacaggatgaacagccagtacgacatcaaccctccaccagacaagatcaccagcgacgacttcta
ggactctccaagaatacgaagaaatcgacgacatcatagacaacatgtgcccattcaacaag
agcaagccaaggaaaagatccaggaggatgcacataatgaagacgaagaacacgccgaaggat
caagtgaccagaccacacagatgtctacaattcaatactggagactcaatacatattactttcaaaca
agaagatacttcaattcgacgctgccaatgatggaaactcgacggaaaaatttatactgcctcccacta
cattggatgaacttatctctatggctaaagagcagcgacagttcagcaacagaaacacaacgatataa
gatggtaaaatcaatgatgaagacctacggatggaaagtacataaagcaggcgtagtgatgcactcgatg
gtacccttatgaaagacttaaaagtacaggaggcacatcatttgagactctcacatttacagacaccca
tattagaaatattaaggatactactggactacataatcaactatcaactaaggaagccgacgtaacatg
gc

ANEXO 2

Probable estructura secundaria de la simple cadena de ADN del IHHNV



Probabilidad de los pares de bases



Para obtener esta estructura secundaria tridimensional termodinámicamente más favorable se ingresó la secuencia completa del genoma del IHHNV (4 kb aproximadamente) en la página web <http://rna.tbi.univie.ac.at/> en la sección **RNAfold web server** donde hace la predicción de la estructura secundaria del ADN de simple cadena (IHHNV).

ANEXO 3

Secuencia del IHHNV con sitios Hae III indicados en rojo

tagagcgcgaagcgcgagatccatcattaaattagtggtatgacgtcacatattaagttaacggtttctgcg
aagcgcttcgcaggaaaccgttacaacctatgacgtcataggtcctatataagagatgacggactcaccg
gtctcccagtttctaactgacgagtgaaagggctattccaagtgacttaggacaatggaaacatggaagat
acgaacgaccacctatggcaatcaatacctagtccgtcattattggatcatcaagtaacagtgaaaccaac
agaagctttcaaacgtcttcggagaaagacaaacccaaggatacaaatgtaagtacaagtgactgact
aagtgacgatccattaaattcctaattgacgcaagtgacgacgtcatatgctgacttacaacagcgtaac
cgctttcgtccatcactcacatatactttctctacctttcagacaacataccccaacaaatcgcgtgcgctact
gcccagatcacattctaccgtgacgatccattaaattcctaattgacgcaagtgacgacgtcatatgctcac
ttacaaaagacgtaaccgctttcgtccatcactcacatatactttctctacctttcagacgacataccccaaca
aatatcgctacgctactgcccagatcacattctaccgtggtgcttcatagggaaacagacccggtttctactg
ctctgcaacgagtggtttatagacaatctcaatgtcaacggacagtgcttactgtcatcccgcgacgacgaa
gaatggacagaaaatatggccaaaggacatactgcatacacgtcagggcgaaccagaatcacttagtga
attgcttcgagaacgcacgaacgaaactcactccagccaggggaatttccaagccttctaccccaggtc
caaatcaagaccctaaaccactaccgaacaacttctaataatgtctgaagaactgtccagtttcagacga
ggaagacaactctcaaacctcctcaagaactcaacaccagaacaaactgatcctaaggtctgctggtgat
aacctgggaattcgagaggggaacaggaacggaacaattcaactggaagtgaatcagaaacctccctt
ggaagtgtggaacagtaatgacaggggtaaaaagagacagagaggaattacttcatcagtgacac
atcagattcctccggatcagatgacgaaaatctgggtacaccacatcgaataaaagaaccagaaactc
caaccacaaaagagacagggcggaggagacaaccgacgacatcaggaaagcgtatcaggaagca
atggaaatcgactggaacctaccgatggaggagagagctgtagtagcggaaacacaacccgactttattg
aagggactcccaacggaccggacgaaatggacggaaggcgcactggaagagagtgagattgataaac
aagtggaaagtacaacatggtacaccttgcctcagagaaaaaccacaaccaagaagactctccgga
cgaacgcaaactcaccattacagatcatggtgaccactggcacatcacatactccggacaccaacca
ataagaccagacatagagctacaatcctcgcctatttgggagttaccttctgctgcccagagccgaagctgaa
gcgactacggacttggtagaaatcaagagatggatactctatcttatcagatacggattgaacggctttc
gtatttggcttggccacgccatttttaacgaatcatcaataacttccaacaatacagaagagacgaagac
gcagtagacggaccatgtccatatactgactactacaagagaagaccgcgctgaagaaaacctaaaga
aaacagtgacagaatgactacctccaacacttagtcaaaaaccaagtcagcaagaacagtacaagaact
tgtcaataaactgacgatgaagaatataaacaactatggacccgtaccagaggacaatataagacaa
actcagaggaatattaactactacaacaagaagaaagtcaaaccaagccaactgtcactaattac
aaacctgcagaatatacctcaaaagaaaaccagactacgacaatatgcagtggataaaatcatggttagc
caacaacgacatccgtgtaccagaaatcttagcttggataatcatcgtagcagacaaaaactggacaaa
ataaacactcttgtactccaaggaccaacaggaacaggaaaaatctcttaccatcgggtgactactcggaa
aactgaacactggcctagtaacaagaacaggagactcaaacaccttccatctcaaaaacctcatcggaa
agtcctacgctctctcgaagaaccagaatcagtcataaacagtgacgactcaaacctctttcgaag
gatcagacttagaagtaaacataaaacaccaagagtcagaaattatgggacgaataccaatctcatatc
aacaacaaagatatagactactgggtacctcCAGCTGatggtaagctctacaacaagaacaaa
aacctccacctgacaagacaaaataaaaagccctcagacaggatgaacagccagtagcagatcaacc
ctccaccagacaagatcaccagcgcgacttcttaggactctccaagaatacgaaggaatcgcg

**ADN 3' al último sitio de restricción Hae III en el genoma de IHNV
(Círculo 2)**

NNNNNNNNNNNNNNNNNNggccctcagacaggatgaacagccagtagacatcaaccctcca
ccagacaagatcaccagcgacgacttcttaggactctccaagaatacgaagaaatcgacgacatc
atagacaacatgtgcccgattcaacaagagcaagcccaaggaaaagatccaaggaggatgcacat
aatgaagacgaagaacacgcccgaaggatcaagtgaccagaccacacagatgtctacaattcaatac
tggagactcaatacatatttccaacaagaagatacttgaattcgacgctgccaatgatggaaactc
gacggaaaaaatttatactgctcccactacattggatgaacttatctctatggctaaagagcagcgaca
gtcagcaacagaaacacaacgatataagatggtaaatcaatgatgaagacctacggatggaaagtac
ataaagcaggcgtagtgtgactcgtatggtaacccttatgaaagacttaaaagtatcaggaggcacatc
atggagactctcacatttacagacaccccatattagaaatattaaggatactactggactacataatcaact
atcaactaaggaagccgacgtaacattggcaaaatggatacaaaaatccccaaactgtgaccgtacaatca
acagcagcaaaactatgaagacccaatccaacaattggattcatggaacaaatgcaaccgggtgacaga
aaagcctatacaatccatggtagactagaaattggatggcggagaaataccaacaaccggaccacc
tcatcccaaaatgggggtgtcaatataatgggacaacccatccctggaaacctagtctaccagcaga
ccaccatacaaacgactggcaacagatcttcatgagaatgtaccaatcaaaggaccaaattggagacg
aacttaaactggctgcagagtacaagccgacttctctacacctagaagtacgactcccaccacaagga
tgtgtcgaagtttggggatgttacaatatctcacgcaccatgtactggacaacttaacaaatgttatattg
cataactaataatattcgatgtgcaatatatacccgattatccagctttaccaataaacatatatagctt
attatcatctatacctaccctatatacataccagctaccaggcaaggtgggactccggctaccagggcatg
gtgggacacttttcttattgacgacatatttctgacttacgtcacttcaaaaagactaaaatccctatcgta
gtcagtcatttagagtcaggatattgtccgcccacttagagcggaagcgcgagatccatcattaaatt
agtggatgacgtcacatattaagtaacggttctgcaag**NNNNNNNNNNNNNNNNNN**

Púrpura: iniciadores reversos

Azul: iniciadores forward

N: cualquier nucleótido, correspondiente a posibles secuencias del
hospedero flanqueando el sitio de integración viral

BIBLIOGRAFIA

- (1) Lightner, D., Redman, R., Bell, T., Brock, J. (1983a). Detection of IHNV virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii. *J World Maric Soc*, **14**: 221-225.
- (2) Kalagayan, H., Godin, D., Kanna, R., Hagino, G., Sweeney, J., Wyban, J., and Brock, J. (1991). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome (RDS) of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *J. World Aquacult. Soc.* 22, 235-243.
- (3) Nunan, L., Poulos, B., Lightner, D. (2000). Use of polymerase chain reaction for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in Penaeid Shrimp. *Marine Biotechnology*, 2: 319-328.
- (4) Sun Zhao-Feng, Hu Chao-Qun, Ren Chun-Hua, Shen Qi, 2006. Sensitive and rapid detection of infectious hypodermal and

hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in shrimps by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods* 131, 41-46.

- (5) Braz, Regina de Fátima Cimária Porfírio Rodrigues de Oliveira da Silva, Lígia Garcia Reis, Pedro Carlos Cunha Martins, Mauricio Pereira de Sales, Rosely Vasconcelos Meissner (2008). Prevalence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Penaeus vanamei* cultured in northeastern Brazil. *Aquaculture* 288: 143-146
- (6) Tang, K. and Lightner, D. (2006) Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)-related sequences in the genome of black tiger prawn *Penaeus monodon* from Africa and Australia. *Virus Research*, 118: 185-191.
- (7) Saigo, K, Yoshida K, Ikeda R, Sacamoto Y, Murakami Y, Urashima T, Asano T, Ken mocha T, Inoue I. (2008). Integration of hepatitis B virus DNA into the myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (MLL4) gene and rearrangements of MLL4 in human hepatocellular carcinoma. *Hum Mutat* 29(5): 703-708.

- (8) Varela, M., Spencer TE, Palmarine M, Arnaud F. (2009) Friendly viruses: the special relationship between endogenous retroviruses and their host. *Ann N Y Acad Sci.* 1178, 157-72.
- (9) Cheung, A., Hoggan M., Hauswirth W., Berns K. (1980). Integration of the adeno-associated virus genome into cellular DNA in latently infected human Detroit 6 cells. *Journal Virology*33(2), 739-748.
- (10) CifuentesMercedes Salcedo, Jesús Cabrera, Yesid Cuesta-Astraz, Edwin Carrascal, Yoshito Eizuru, Martha C. Domínguez, Adalberto Sánchez, Felipe García-Vallejo (2009). Expansión clónica y caracterización genómica del proceso de integración del virus linfotrópico humano tipo I en la leucemia/linfoma de células T en adultos. *Biomédica* 29: 218-231.
- (11) Mari. J., Bonami J R, Lightner D. (1993). Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimp; diagnosis of the disease using a specific probe. *J Gen Virol* 74(Pt 12): 2637-2643.
- (12) Bonami, J.-R., Trumper, B., Mari, J., Brehelin, M., and Lightner, D. (1990). Purification and characterization of the infectious hypodermal

and hematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. *J. Gen. Virol.* 71, 2657-2664.

- (13) Shike, H., Dhar A.K., Burns J., Shimizu C., Jousset F., Klimpel K., and Bergoin M., (2000). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of shrimp is related to mosquito Brevidensovirus. *Virology* 277: 167-177.
- (14) Berns, K., Bergoin, M., Bloom, M., Lederman, M., Muzuczka, N., Sielg, G., Tal, J., Tattersall, P. (1995). *Parvoviridae*: VIth report of international committee on taxonomy of viruses. *Arch Virol Suppl*, 10: 169-178.
- (15) Tattersall, P. and Ward DC. (1976) Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA. *Nature*. 263(5573): 106-109.
- (16) Samulski, R., Srivastava, A., Berns K., Muzyczka, N., (1983) Rescue of adeno-associated virus from recombinant plasmids: gene correction within the terminal repeats of AAV. *Cell*. 33(1): 135-143.

- (17) Astell, C., Chow, M., Ward, D., (1985) Sequence analysis of the termini of virion and replicative forms of minute virus of mice DNA suggests modified rolling hairpin model for autonomous parvovirus DNA replication. *J Virol.* 54(1): 171-177.
- (18) Vago, C., Meynardier, G., and Duthoit, J. L. (1964). Etude d'un nouveau type de maladie à virus chez les lépidoptères. *Ann. Epiphyties* 15, 475-479.
- (19) Boublik, Y., Jousset, F., Bergoin, M. (1994) Complete nucleotide sequence and genomic organization of the *Aedes abapictus* parvovirus (AaPV) pathogenic for *Aedes aegypti* larvae. *Virology.*200(2) 752-763.
- (20) Afanasiev, B., Galyov, E., Buchatsky, L., Kozlov, Y., (1991) Nucleotide Sequence and genomic organization of *Aedes densonucleosis* virus. *Virology.* 185(1): 323-336.
- (21) Cotmore, S., Tattersall, P. (1989) A genome-linked copy of the NS-1 polypeptide is located on the outside of infectious parvovirus particles. *J Virol.* 63(9): 3902-3911.
- (22) Rhode, S., 3rd (1985) trans-Activation of parvovirus P38 promoter by the 76 K noncapsid protein. *J Virol.* 55(3): 886-889.

- (23) Cotmore, S., Tattersall, P. (1987) The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv Virus Res.* 33: 91-174
- (24) Perros, M., Deleu, L., Vanacker, J., Kherrouchez, Spruyt N., Faisst. S., Rommelaere, J. (1995) Upstream CREs participate in the basal activity of minute virus of mice promoter P4 and its stimulation in ras-transformed cells. *J Virol.* 69(9): 5506-5515.
- (25) Sol, N., Le Junter, J., Vassias, I., Freyssinier, J., Thomas, A., Prigent, A., Rudkin, B., Fichelson, S., Morinet, F. (1999) Possible interactions between the NS-1 protein and tumor necrosis factor alpha pathways in erythroid cell apoptosis induced by human parvovirus B19. *J Virol.* 73(10): 8762-8770.
- (26) Astell, C. (1990). Terminal hairpins of parvovirus genomes and their role in DNA replication. *In CRC Handbook of Parvoviruses* (P. Tijssen, Ed.), Vol. 1, pp. 59±79. CRC Press, Boca Raton, FL.
- (27) Dhar A., Lakshman, D., Natarajan, S., Thomas, F. and van Beek, N. (2007) Functional characterization of putative promoter elements from infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in

shrimp and in insect and fish cell lines. *Virus Research*, doi: 10.1016/j.virusres.2007.03.007.

- (28) Lotz J., (1997) Disease control and pathogen status in an SPF-based shrimp aquaculture industry, with particular reference to the United States. *Diseases in Asian Aquaculture III*, Flegel T.W. and MacRae I.H., eds. *Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines*, 243-254.
- (29) Motte E., Yugcha E., Luzardo J., Castro F., Leclercq G., Rodríguez J., Miranda P., Borja O., Serrano J., Terreros M., Montalvo K., Narváez A., Tenorio N., Cedeño V., Mialhe E., Boulo V., 2003. Prevention of IHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 219, 57-70.
- (30) Bell T., and Lightner D., 1984. IHNV virus: Infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 38, 185-194.
- (31) Pantoja C. Morales and Lightner (1991) Status of the presence of IHNV virus in wild penaeid shrimp from the coast of Sonora. Mexico.

Soc. Invertebrate Pathology. Program and Abstracts, XXIV Annual Meeting. Northern Arizona Univ., p. 39.

- (32) Lightner D., (1996a) A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. *World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.*
- (33) Primavera, J. and Qunitio, E. (2000) Runt-deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *J Crustac Biol*, 20: 796-802.
- (34) Brock, J., Lightner, D. and Bell. (1983) A review of four viruses (BP, MBV, BMN and IHNN). Diseases of penaeid shrimp with particular reference of clinical significance, diagnosis and control in shrimp aquaculture. *Proc. 71st Intl. Council for the Exploration of the Sea, C.M. 1983/Gen: 10/1-18.*
- (35) Lightner, D., Redman R., Bell, T., and Brock, J. (1983b). Detection of IHNN virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii. *J. World Maricul. Soc.* 14, 212-225.

- (36) Bell, T., and Lightner D. V. (1987) IHHN disease of *Penaeus stylirostris*: effects of shrimp size on disease expression. *J Fish Dis.*, 10: 165-170.
- (37) Brock and Lightner (1990) Diseases of Crustacea. Diseases caused by microorganisms. In: O. Kinne (ed.), *Diseases of Marine Animals. Vol. 3. John Wiley. New York*, pp. 245-349.
- (38) Lightner D. (1992) Shrimp virus diseases: Diagnosis, distribution and management. In: J. Wyban (ed.), *Proc. Special Session on Shrimp Farming World Aquaculture Soc., Baton Rouge*, pp. 238-253.
- (39) Pantoja, C. y Lightner, D. (2008). Enfermedades virales pp. 63. En: Morales, V. y J. Cuéllar- Anjel (eds.). 2008. Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá. 270 pp.
- (40) Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2006). Manual de diagnóstico para los animales acuáticos.
- (41) Lightner, D., Redman, R., Poulos, B., Numan, L., Mari, J., Hasson, K. (1997) Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the

international movement of live and frozen shrimp. *Rev Sci Tech.* 16(1): 146-160.

- (42) Lightner, D., and Redman, R..(1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture.*164: 201-220.

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

- (44) Tang, K.,and Lightner, D., (2002). Low sequence variation among isolates of infectious hypodermal and hematopietic necrosis virus (IHHNV) originating from Hawaii and the Americas. *Diseases of Aquatic Organisms* 49, 93-97.

- (45) Tang, K., Poulos, B., Wang, J., Redman, R., Shih, H. and Lightner, D. (2003a) Geographic variations among infectious hypodermal and hematopietic necrosis virus (IHHNV) isolates and characteristics of their infection. *Diseases of Aquatic Organisms*, 53: 91-99.

- (46) Atchison, R. W., B. C. Casto, and W. McD. Hammon. 1965.
Adenovirus-associated defective virus particles. *Science* 194:754-756.
- (47) Berns K., and Linden R. (1994) The cryptic life style of adeno-associated virus. *Bioassays*. 17(3): 237-245.
- (48) Srivastava, A., Lusby, E., Berns, K. (1983) Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J virol* 45(2): 555-564.
- (49) Samulski, R., Chang, L., Shenk, T. (1989) Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol*. 63(9): 3822-3828.
- (50) Labow, M., Berns, K., (1988) The adeno-associated virus rep gene inhibits replication of an adeno-associated virus/simian virus 40 hybrid genome in cos-7 cells. *J Virol*. 62(5): 1705-1712.
- (51) Kotin, R., Linden, R., Berns, K. (1992) Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non homologous recombination. *EMBO J*. 11(13): 5071-5078.

- (52) Samulski, R., Zhu, X., Xiao, X., Brook, J., Housman, D., Epstein, N., Hunter, L. (1991) Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J.* 10(12): 3941-3950.
- (53) Kotin, R., Siniscalco, M., Samulski, R., Zhu, X., Hunter L., Laughlin, C., McLaughlin, S., Muzyczka, N., Rocchi, M., Berns, K. (1990) Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(6): 2211.2215.
- (54) Weitzman, M., Kyostio, S., Kotin, R., Owens R. (1994). Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91(13): 5808-5812.
- (55) Handa, H., Shiroki, H., Shimojo, H. (1977). Helper factor(s) for growth of adeno-associated virus in cells transformed by adenovirus 12. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(10): 4508-4510.
- (56) Bantel-Schaal, U, Stöhr, M. (1992) Influence of adeno-associated virus on adherence and growth properties of normal cells. *J Virol.* 66(2):773-9.

- (57) Walz, C., Schlehofer, J.R. (1992) Modification of some biological properties of HeLa cells containing adeno-associated virus DNA integrated into chromosome 17. *J Virol.* 66(5):2990-3002.
- (58) Winocour, E., Puzis, L., Etkins, S., Kocht, Danovitch, B., Mendelson, E., Shaulian, E., Karby, S., Lavis (1992). Modulation of the cellular phenotype by integrated adeno-associated virus. *Virology* 190 (1): 316-329.
- (59) Tang, K., Poulos, B., Wang, J., Redman, R., Shih, H. and Lightner, D. (2003b) Geographic variations among infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) isolates and characteristics of their infection. *Diseases of Aquatic Organisms*, 53: 91-99.
- (60) Berns (1990) Parvovirus Replication. *Microbiological Reviews*. P. 316-329.
- (61) Yeates, C., Gillings M., Davison, A., Altavilla, N., Veal, D. (1998) Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biol Proced Online* 14;1: 40-47.

- (62) Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- (63) Castro, J. (2009) Desarrollo Y Análisis Del Sistema Conjunto PCR/Dot Blot Para La Detección Del Virus De La Necrosis Hipodérmica Y Hematopoyética Infecciosa. Tesis de Grado, ESPOL.