Silenciamiento de Posibles Genes Antivirales en *Litopenaeus vannamei* y su Efecto en la Susceptibilidad al Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV)

Mirabá M., Morán A., Robalino J.
Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Campus Gustavo Galindo, Km 30.5 vía Perimetral, Apartado 09-01-5863. Guayaquil-Ecuador, mmiraba@espol.edu.ec, bmoran@espol.edu.ec, jrobalin@espol.edu.ec.

Resumen

En el presente trabajo se evaluaron las posibles funciones antivirales de 54 genes candidatos en Litopenaeus vannamei. Se utilizó, un sistema de infección experimental donde la susceptibilidad al Virus de la Mancha Blanca (WSSV) fue cuantificada posterior al silenciamiento de cada uno de los 54 genes, utilizando la técnica de ARN de interferencia (ARNi). El objetivo de estas pruebas fue la identificación de genes en L. vannamei cuya expresión influencia la respuesta del hospedero ante infecciones con WSSV. Para el 41% de genes (22 genes), el silenciamiento resultó en una alta mortalidad, independientemente de si los animales fueron o no infectados experimentalmente con WSSV, y por lo tanto su posible rol en la respuesta antiviral no pudo ser determinado. Entre el 59% de los genes restantes, se detectó un gen de potencial interés, cuyo silenciamiento resultó en la protección de camarones infectados contra la letalidad inducida por WSSV. En base a estos resultados se propone la hipótesis que este gen, cuyo potencial codificante corresponde a una posible proteasa, regula positivamente el ciclo infeccioso y/o la patogénesis de WSSV en L. vannamei. Estudios futuros serán necesarios para confirmar los fenotipos observados en este trabajo, y en especial para determinar el posible rol de esta proteasa en la interacción de WSSV con el hospedero.

Palabras Claves: *ARNi, dsRNA, respuesta antiviral, genes.*

Abstract

In this study, the antiviral roles of 54 candidate genes from Litopenaeus vannamei, was evaluated. An experimental infection system was used, to assess the susceptibility to WSSV of shrimp where each one of the 54 candidate genes was knocked down by means of RNAi. For 41% of genes (22 genes) high levels of mortality were observed as a result of their silencing, independently of whether the animals were experimentally infected with WSSV, and thus their possible roles in the antiviral response could not be determined. Among the remaining 59% of genes, a phenotype of interest was observed for only one gene, whose silencing resulted in significant protection from the lethality of WSSV infection. We propose based on these data that this gene, which seems to encode a putative protease, may participate in regulating the life cycle and/or the pathogenicity of WSSV. Future studies will be needed to verify the phenotypes observed in this study, and especially to determine the possible roles of the gene identified here as a putative protease in regulating the WSSV-host interaction.

Keywords: *RNAi, dsRNA, antiviral response, genes.*

1. Introducción

Uno de los problemas de mayor impacto para el cultivo de camarón blanco *L. vannamei* en el país durante los últimos años ha sido el Síndrome de la Mancha Blanca, causado por el virus que lleva el mismo nombre (*i.e.,* WSSV) [1,2]. Esta enfermedad puede ocasionar mortalidad de hasta el 100% en los sistemas de producción [3] y, hasta la fecha, existen pocas estrategias eficaces para mitigar su impacto en operaciones comerciales.

Investigaciones han demostrado que la maquinaria de ARN de interferencia (ARNi) está presente en camarones peneidos como el *L. vannamei* y que genes endógenos pueden ser silenciados específicamente mediante la inyección de ARN de doble cadena (dsRNA) [4, 5]. El dsRNA es un potente inductor de respuestas antivirales en muchos organismos, incluido el camarón [4, 5, 6, 7], a través de la activación de mecanismos de silenciamiento genético como ARNi y de otras respuestas inmunes innatas [8, 9]. El ARNi es un proceso natural por el cual ARN de doble cadena es catalizado por enzimas específicas para convertirlo en ARN de 20-25 nt (siRNA, siglas en inglés) que dirigen el silenciamiento de genes homólogos [8, 9]. El ARNi se ha utilizado para inhibir específicamente la expresión de genes y la replicación de virus infecciosos [10].

El presente trabajo tiene como objetivo principal identificar genes involucrados en la respuesta antiviral del camarón *L. vannamei.* Se evaluaron 54 genes considerados candidatos en base a estudios previos de respuesta antiviral en *L. vannamei* [11, 12]. Estos genes fueron seleccionados en base a tres criterios: 1) su expresión aumenta en respuesta a una inyección de dsRNA (dsRNA es un estímulo antiviral en camarones), 2) su expresión aumenta en respuesta a infección con WSSV, ó 3) su importancia para el sistema inmune del camarón ha sido determinada en estudios previos. Cada uno de los 54 genes candidatos cumple con al menos uno de estos 3 criterios.

Además de la evaluación funcional de estos genes *in vivo* (mediante desafíos virales), el análisis bioinformático de sus secuencias permitió predecir las proteínas putativamente codificadas por cada uno de los genes estudiados.

En su conjunto, el estudio planteado sirvió para demostrar la factibilidad de usar el ARNi en combinación con pruebas de infección experimental, con el fin de definir genes de importancia para la respuesta antiviral del camarón. El conocimiento de las bases genéticas y moleculares del sistema inmunitario antiviral del camarón permitiría desarrollar estrategias de control eficaces, basadas en profilaxis y mejoramiento genético.

2. Materiales y Métodos.

2.1 Sistema de desafíos

Para cada tratamiento se utilizaron 40 individuos (camarones *L. vannamei* de 0.8 a 1g) colocados en sistemas de desafíos individuales (recipientes de plástico) con aprox. 150 ml de agua de mar previamente desinfectada con cloro, aclimatados por un período de 2 a 3 días, con un recambio diario del 100 %, y alimentados diariamente con alimento comercial para camarones.

Después de la aclimatación, los animales fueron tratados con una inyección intramuscular de dsRNA (4 ug/ind.) en el cuarto segmento abdominal y 72 horas más tarde fueron desafiados con dosis de WSSV calibradas para causar 60-80% de mortalidad. En los tratamientos que no fueron desafiados con WSSV se les suministró inyección con solución salina. La mortalidad fue registrada diariamente durante 18 días.

Como controles se utilizaron animales inyectados con solución salina estéril (control negativo, 10mM Tris-Cl pH 7.5, 0.4M NaCl), animales inyectados sólo con WSSV (control positivo) y animales inyectados con dsRNAs de secuencias no relacionadas a genes de camarón (dsRNA inespecífico; 95114A, que representa una porción de 309 pb de ADN genómico de *Anas platyrhynchos* con # GenBank AJ312200 o S114, que representa un fragmento de 1316 pb de ADN genómico de *Ictalurus punctatus* con # GenBank CC936713).

Aparte de estos controles generales, para cada gen se llevó un control adicional que constó de animales inyectados con el dsRNA homólogo al gen de estudio, pero sin infección con WSSV.

2.2 dsRNA

Los dsRNA fueron obtenidos por transcripción *in vitro*.

Los substratos para la transcripción se generaron mediante PCR, usando iniciadores universales para incorporar promotores que permitan la síntesis de los ARNs correspondientes (GAATTAACCCTCACTAAAGGGATCGAGCGGCC GCCCGGGCAGGT y GTAATACGACTCACTATAGGGCGAGCGTGGTC GCGGCCGAGGT ó GAATTAACCCTCACTAAAGGGACTCGGGAAGC GCGCCATTGTG y GTAATACGACTCACTATAGGGCGCGAATTGGC CAAGTGAGCTCG).

Se amplificaron insertos de ADN en ADN complementario (cDNA, en inglés) clonado de *L. vannamei*. Los productos de PCR fueron purificados (QIAquick PCR Purification Kit) y usados para realizar transcripción *in vitro* con ARN polimerasas T7 y T3 (Promega). Para degradar el ADN presente en la reacción de transcripción se adicionó DNase I (Promega) en una relación de 1U/ug de sustrato.

Los transcritos obtenidos fueron purificados con extracción con solventes orgánicos y precipitados con etanol por métodos estándar. Posteriormente las cadenas simples de ARN (T3 y T7) fueron resuspendidas en 400ul de solución salina (10mM Tris-Cl pH 7.5, 0.4M NaCl).

Los transcritos fueron colocados en un tubo de 1,7 ml para ser hibridados, e incubados a 75ºC por 15 min, a 65 ºC por 15 min, y finalmente a temperatura ambiente por 15 min. La formación de dsRNA fue monitoreada en geles de agarosa (electroforesis), y la concentración de dsRNA se midió por espectrofotometría.

Todos los clones de ADN representando genes expresados (cDNAs) o fragmentos de cDNAs de *L. vannamei* fueron gentilmente donados por el Marine Genomics Group de la Medical University of South Carolina (Charleston, SC, EUA). La generación de las librerías de cDNA utilizadas para generar estos clones, así como los métodos utilizados para evaluar la expresión de estos genes han sido descritos por Robalino y colaboradores [11, 12].

2.3 Análisis Bioinformático

El análisis bioinformático de ESTs (Expressed Sequence Tags, en inglés) permitió reconstruir las posibles regiones codificantes de los 54 genes candidatos, predecir las proteínas putativamente codificadas en cada uno, y generar información sobre las funciones o actividades asociadas con estos genes. La mayoría de los 54 genes evaluados en este estudio fueron seleccionados porque, en base a estudios de expresión utilizando chips de ADN (microarrays, en inglés), mostraron ser inducidos en animales inyectados con dsRNA o infectados con WSSV [12].

La reconstrucción de los genes putativos fue realizada con la ayuda de varios software de acceso público. El primer paso fue la reconstrucción de la secuencia más larga posible de cDNA para cada gen. Para esto se recopilaron de GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI) todos los ESTs de *L. vannamei* con identidad significativa a un EST inicial y se ensamblaron en una secuencia contigua (*i.e.,* contig) utilizando el software CAP3 [13, 14]. A partir del contig generado con CAP3 se establecieron las posibles regiones codificantes, estableciendo el codón de iniciación y marco de lectura más probables. Se consideró como marco de lectura más probable aquel que representa el polipéptido más largo posible con homología a proteínas presentes en otros organismos. En caso de no existir homología con otras proteínas conocidas, se consideraron tanto la longitud del polipéptido como la presencia de posibles dominios funcionales.

Para la traducción de las secuencias se usó el software EXPASY Proteomics Server [15] y para la determinación de las proteínas e identificación de los dominios funcionales se utilizó la herramienta BLAST (Basic Local Aligment tools, en inglés) de NCBI (*i.e.,* blastx, blastp) [16].

2.4 Análisis Estadístico

Para interpretar los resultados obtenidos en los desafíos experimentales se realizaron dos tipos de análisis:

1. Tablas de contingencia, para analizar si existe relación de dependencia o independencia entre las variables del estudio. Las variables estudiadas fueron: supervivencia y tratamiento con dsRNA. Se analizaron tablas de tamaño 2x2, diseñadas para comparar la supervivencia (al final del periodo de desafío) en el grupo de animales inyectados con cada dsRNA específico versus la supervivencia en el grupo control correspondiente.

La prueba hace uso del estadístico $\chi 2$ (Chi-cuadrado) para estimar un valor de p (con 1 grado de libertad) asociado con la hipótesis de que las variables analizadas son independientes. La Figura 1 presenta un esquema de este análisis.

Mort.	**dsRNA-sal**	**Neg**	**Total**
m	n_{ij}	n_{ij}	$n_{i.}$
v	n_{ij}	n_{ij}	$n_{i.}$
Total	$n_{.j}$	$n_{.j}$	N

Mort.	**dsRNA -WSSV**	**dsRNA Inespecífico-WSSV**	**Total**
m	n_{ij}	n_{ij}	$n_{i.}$
v	n_{ij}	n_{ij}	$n_{i.}$
Total	$n_{.j}$	$n_{.j}$	N

N = tamaño de la muestra
n_{ij}= número de observaciones
$n_{i.}$= números de individuos en filas
$n_{.j}$= número de individuos en columnas
m = muertos
v = vivos

Figura 1. Modelo aplicado para el análisis en tablas de contingencias.

2. El segundo parámetro calculado a partir de los datos de supervivencia es un índice de susceptibilidad, que permite clasificar los fenotipos observados, basado en el valor y signo del índice. Un signo positivo indica una función anti-viral del gen, mientras que un signo negativo indica una función pro-viral (Ecuación 1).

$$I.Sucp. = \frac{(\text{M. Ac. dsRNA específico con WSSV}) - (\text{M. Ac. dsRNA Inespecífico con WSSV})}{\text{M. Ac. solución salina con WSSV}}$$

M.Ac = mortalidad acumulada
I.Sucp. = índice de susceptibilidad

Ecuación 1. Índice de susceptibilidad.

3. Resultados-Discusión

3.1 Fenotipos asociados con genes candidatos en animales desafiados con WSSV.

En esta investigación se definieron cuatro posibles fenotipos (Figura 2) en base a la mortalidad en grupos de animales tratados con diferentes dsRNAs, y monitoreados en el transcurso de 21 días que duraba cada desafío.

A. Fenotipo no determinado: En caso de que la expresión del gen candidato no influya en la supervivencia de animales, ya sea en presencia o ausencia de infección con WSSV, se espera observar resultados similares a la Figura 2-A. En este caso, la mortalidad de animales inyectados con dsRNA contra el gen de interés es similar a la mortalidad en animales inyectados con dsRNA inespecífico, en presencia de WSSV. De igual forma, la inyección del dsRNA contra el gen de interés no causa mortalidad significativa en ausencia de infección. En resumen, reportamos ausencia de fenotipo cuando tanto en presencia como ausencia del virus, la mortalidad en animales en los cuales se asume que la expresión del gen de interés ha sido bloqueada es similar a la mortalidad en los controles respectivos. Cabe recalcar que esta interpretación, al igual que todas las interpretaciones fenotípicas presentadas en este trabajo, presume el bloqueo exitoso de la expresión del gen de interés. Dicho bloqueo, sin embargo, no fue confirmado en este estudio.

B. Gen esencial: En este fenotipo, la inyección de dsRNA contra el gen de interés causa mortalidad significativa aún en ausencia de infección viral (Figura 2-B). Desde el punto de vista estadístico, la mortalidad en estos animales es mayor a la observada en animales del control negativo no infectados. En estos casos, la posible función antiviral del gen de interés no puede ser evaluada utilizando el sistema de infección experimental, puesto que la mortalidad atribuible a WSSV no puede ser diferenciada de la mortalidad atribuible a la función esencial del gen.

C. Gen pro-viral: En este fenotipo la mortalidad observada al bloquear el gen e infectar con WSSV es significativamente menor a la mortalidad en animales tratados con dsRNA inespecífico e infectados con WSSV. En este caso, bloquear el gen causa que los animales sobrevivan mejor a la infección viral. Este resultado indicaría que bajo condiciones normales, la expresión de este gen juega un papel en el ciclo infeccioso o en la patogénesis del virus. Dicho fenotipo no es inesperado, ya que el carácter de parásito intracelular obligado de los virus implica la utilización de factores del hospedero para completar su ciclo de vida. (Figura 2-C).

D. Gen anti-viral: Este fenotipo se caracteriza por un incremento significativo en la mortalidad en animales inyectados con dsRNA específico contra el gen de interés, posterior a la infección con WSSV (Figura 2-D). Esta mortalidad es estadísticamente mayor a la observada en animales infectados y tratados con dsRNA inespecífico. Además, como pre-requisito para atribuir este fenotipo a un gen en particular, la inyección del dsRNA específico no debe causar mortalidad significativa en animales no infectados.

De los 54 genes evaluados, 22 (41%) mostraron un fenotipo esencial, 31 (57%) no presentaron fenotipo alguno, mientras que para un gen se observó un nivel de protección significativamente mayor al observado en animales inyectados con dsRNA inespecífico (*i.e.,* fenotipo pro-viral, con I.Susc= -0,38). Las posibles proteínas y dominios funcionales codificados por cada gen evaluado, así como su fenotipo en las pruebas de infección experimental son presentadas en las Tablas 1 y 2.

Genes esenciales: Las funciones de algunos de estos genes, predecibles en base al análisis bioinformático realizado (Tabla 1), concuerda con roles en el control a situaciones de estrés y en el plegamiento de otras proteínas. Ejemplos incluyen las chaperonas, tales como Hsp40 y Hsp70 [17, 18, 19, 20, 21, 22], Otro dominio funcional observado en este grupo es el factor anti-lipopolisacárido (ALF), una proteína antimicrobiana con un amplio espectro de actividad contra diferentes cepas de bacterias y hongos [23, 24, 25]. Esta proteína ha sido identificada y caracterizada en varios crustáceos, y estudios en crayfish han demostrado que el ALF interfiere en la propagación del WSSV usando ARNi, y que probablemente juega un papel importante en la defensa inmune contra la infección viral [26].

El hecho que una proporción importante de los genes candidatos estudiados (41%) sean esenciales podría significar que muchos genes cuya expresión aumenta en respuesta a un estímulo inmunitario promueven la capacidad del animal para sobrevivir durante situaciones de estrés (los genes candidatos fueron seleccionados por responder a la inyección de dsRNA, un estimulo antiviral en camarones) [4].

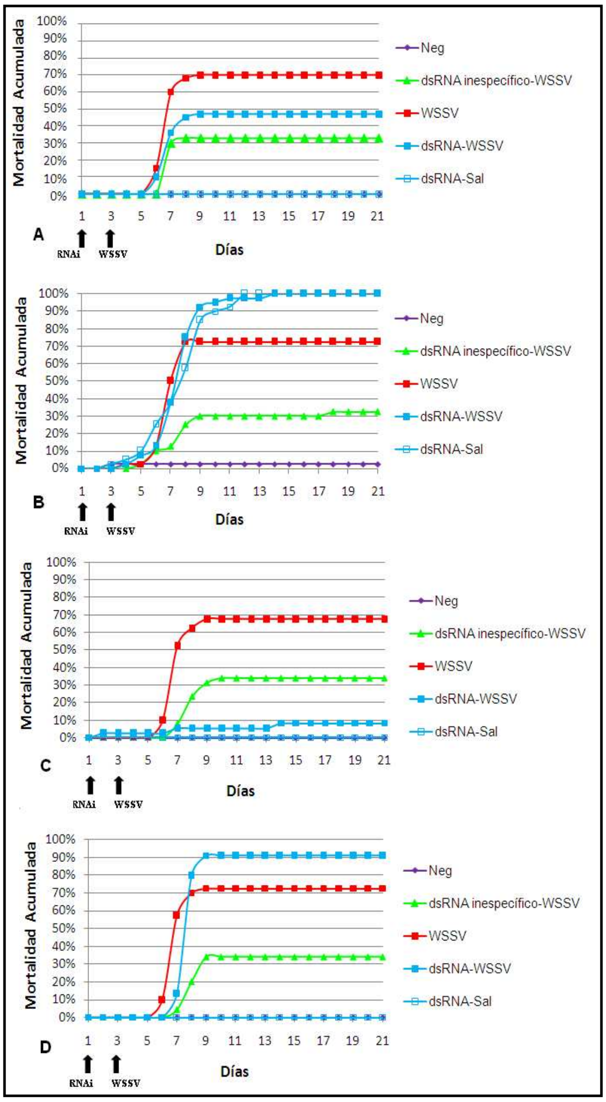

Figura 2: Cuatro fenotipos predecibles en ensayos de susceptibilidad con WSSV. **A.** Fenotipo no determinado, **B.** Gen esencial, **C.** Gen pro-viral, **D.** Gen anti-viral. La interpretación de las curvas de supervivencia se describe en mayor detalle en el texto.

Tabla 1. Genes candidatos con fenotipo esencial.

1 Número de acceso en NCBI correspondiente a la secuencia del clon inicial utilizado en las pruebas de expresión con chips de cDNA.
2 Dominios funcionales detectados utilizando BLASTp en el producto de traducción más probable codificado en el contig final ensamblado con CAP3.
3. Fenotipo observado en pruebas de infección experimental, de acuerdo a lo descrito en el texto.

Nº de Acceso del EST en NCBI 1	Dominio Funcional 2	Fenotipo Observado 3
CK725277	Ldla, CLECT lectina tipo C	ESENCIAL
CK570744	Granulinas	
CK572129	Proteínas de choque térmicoHsp70	
CK571978	Chaperonas	
CK571718	Vigilin	
CK570770	DnaJ o J-DnaJ/Hsp40	
CK572639	WD40	
CK571807	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	
CK743206	ATP sintasa subunidad C	
CK572496	Factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGF; Factor de crecimiento endotelial vascular VEGF	
CK591644	Factor antilipolisacárido	
CV468236	Sar1 Ras-Like GTPasa	
MGID514847	Histona de unión RBBP4 o subunidad C de complejos CAF1	
CV468041	Factor de iniciación eucariótico	
CK571791	Proteínas transportadoras	
MGID513560	Proteosoma C-terminal de la subunidad reguladora	
CK739385	Helicasa con dominio DEAD	
CK572488	ADN helicasa putativa	
MGID515874	sin dominio funcional	
MGID515663	sin dominio funcional	
CK572424	sin dominio funcional	
CK571864	sin dominio funcional	

Genes sin fenotipo: Para 31 de los genes analizados no se detectaron diferencias significativas en la mortalidad causada por WSSV entre animales inyectados con dsRNA inespecífico y aquellos inyectados con dsRNA específicos. Estos resultados sugieren que cada uno de estos genes, individualmente, son dispensables para la respuesta del camarón contra WSSV (Tabla 2).

Cabe recalcar que es posible que en el caso de algunos de estos genes la inyección con dsRNA no es capaz de eficazmente bloquear su expresión. Es posible que algunos genes sean resistentes al ARNi, por la presencia de factores estabilizantes del ARN mensajero, u otros fenómenos aún desconocidos. En efecto, hay casos documentados de proteínas que inhiben el bloqueo vía ARNi mediante interacción directa con ARN mensajeros [27, 28].

De acuerdo al análisis bioinformático estos genes presentaron dominios funcionales pertenecientes al grupo de las proteasas tales como Catepsina D, peptidasa cisteína (C1A), proteosoma C terminal y peptidasa M20/M25/M40 cuya función es la digestión molecular de proteínas no deseadas [29, 30, 31]. Asimismo se encontraron las peroxirredoxinas, tiorredoxinas y peroxidasas, importantes en la reducción de los peróxidos tóxicos para la célula [32].

Tabla 2. Genes sin fenotipo
1 Acceso en NCBI correspondiente a la secuencia del clon inicial utilizado en las pruebas de expresión con chips de cDNA.
2 Dominios funcionales detectados utilizando BLASTp en el producto de traducción más probable codificado en el contig final ensamblado con CAP3.
3 Fenotipo observado

Nº de Acceso del EST en NCBI 1	Dominio Funcional 2	Fenotipo Observado 3
CK571943	Tiolasa	SIN FENOTIPO
CK591675	Dominio de unión al ARN	
CK591701	Cofactor para el doblamiento de tubulina	
CK571271	Peroxidasa	
CK572760	Catepsina D	
CV133220	TB2/DP1 Familia HVA22	
CK591002	Acetil-CoA-Crotonasa/enoil-coenzima	
CK571502	Familia Peptidasa (M20, M25, M40)	
CK592593	Peroxirredoxinas, thiorredoxinas	
CK572962	Dominios relacionados con el fibrinógeno	
CV468320	Peptidasa C1A	
CK572708	ATPasa	
CK571517	Cadherinas	
CK592250	Ribosomal L7Ae	
CV468393	Mesd	
CK572677	Dominio SWIB MDM2	
CK591233	Dominio SWIB MDM3	
CK591012	Inositol polifosfato quinasa	
CK591345	Dominio catalítico,alfa amilasa, alfa, alfa-phosphotrehalase	
CK591327	sin dominio funcional	
CK591655	sin dominio funcional	
CK725284	sin dominio funcional	
CK572442	sin dominio funcional	
CK572120	sin dominio funcional	
CK591121	sin dominio funcional	
CK571145	sin dominio funcional	
CK990141	sin dominio funcional	
CK572416	sin dominio funcional	
CK571262	sin dominio funcional	
CK571457	sin dominio funcional	
CK572105	sin dominio funcional	

Gen pro-viral: El bloqueo de uno de los genes candidatos (# GenBank CK725515), con potencial codificante para una putativa proteasa, resultó en un efecto significativo sobre la capacidad del camarón para sobrevivir la infección experimental con WSSV. El resultado observado para este gen sugiere que la función de esta proteasa sería importante para el ciclo infeccioso y/o la patogénesis del WSSV. Los posibles mecanismos son variados: una posibilidad es que esta proteasa participe en la maduración proteolítica de proteínas virales, ya sean éstas estructurales o no estructurales.

Otra posible explicación para este fenómeno es que la proteasa pro-viral (codificada por el hospedero) sea responsable de causar muerte celular en situaciones de infección con WSSV, y al inhibir su acción, exista una mayor viabilidad celular, reflejada en una mayor supervivencia en animales infectados. Estas son sólo dos de las múltiples interpretaciones posibles para la mayor supervivencia observada al bloquear la expresión de este gen. Alternativamente, es posible que esta proteasa regule negativamente algún mecanismo antiviral, y por lo tanto su silenciamiento resulte en una respuesta antiviral aumentada.

Estudios futuros serán necesarios para comprobar el fenotipo observado, y para determinar el posible rol de este gen en la interacción entre WSSV y el hospedero.

4. Conclusiones

1. El silenciamiento con dsRNA (ARNi) representa un método promisorio para la evaluación funcional de genes candidatos, posiblemente involucrados en procesos de interés en acuicultura, tales como resistencia a enfermedades, crecimiento, y otros. Esta estrategia es particularmente atractiva, considerando la abundancia de secuencias actualmente disponibles en bases de datos públicas.
2. En base a las mortalidades presentadas en el análisis estadístico de los 54 genes evaluados no se evidenció la presencia genes antivirales.

5. Recomendaciones

1. En base a los resultados, se recomienda ampliar estos estudios en busca de genes antivirales en *L. vannamei*.
2. Confirmar los fenotipos identificados en este y en futuros trabajos mediante la cuantificación de los niveles de ARN de los genes bloqueados.
3. Realizar análisis a nivel histológico de animales que presentaron alta mortalidad en ausencia de WSSV (fenotipo esencial), con el fin de determinar posibles cambios histopatológicos asociados con el bloqueo de genes involucrados en la homeostasis o el control del estrés, que aportaría significativamente al conocimiento de la biología de *L. vannamei*.

6. Agradecimientos

- A la Universidad Medica de Carolina del Sur - MUSC (Marine Biomedicine and Environmental Sciences Center) y a la empresa BIOGEMAR S.A por el financiamiento de esta tesis.
- A los profesores de la Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias Del Mar (FIMCM–ESPOL) Ph.D Marcelo Muñoz. Ph.D Washington Cárdenas, M.Sc. Jerry Landívar.

14. Referencias

[1] Calderón, J., B. Bayot, I. Betancourt, and V. Alday de Graindorge. (1999). Monitoreo del virus de la mancha blanca en Ecuador. El Mundo Acuicola 5: 211-214.

[2] Alday de Graindorge, V. y Griffith, D. 2000. Ecuador. In: Thematic review on Management Strategies for Major Diseases in Shrimp Aquaculture. A component of the WB/ NACA/WWF/FAO Program on Shrimp Farming and the Environment. Report of the workshop held in Cebu, Philippines from 28–30 November, 1999. pp. 17–19.

[3] Sahul Hameed AS, Yoganandhan K, Satish S, Murugan V, Rasheed M, Kunthala Jayaraman (2001) Experimental pathogenicity of white spot syndrome virus (WSSV) in two freshwater crabs (Partelphusa hydrodomus and P. pulvinata). Aquaculture 201:179-186.

[4] Robalino, J., Browdy, C.L., Prior, S., Metz, A., Parnell, P., Gross, P. and Warr, G. Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. J. Virol. 2004; 78:10442-10448.

[5] Robalino, J., Bartlett, T., Shepard, E., Prior, S., Jaramillo, G., Scura, E., Chapman, RW., Gross, PS., Browdy, CL., Warr, GW. Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response? J Virol 2005; 79: 13561–13571.

[6] Tirasophon, W., Roshorm, Y., Panyim, S. Silencing of yellow head virus replication in penaeid shrimp cells by dsRNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005; 334:102-107.

[7] Westenberg M., Heinhius B., Zuidema D., Vlak J.M., siRNA injection induces sequence-independent protection in Penaeus monodon against white spot syndrome virus, Virus Res. 114 (2005) 133–139.

[8] Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R. and Hannon, G. J. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. Science 2001; 293:1146–1150.

[9] McManus, M.T. and Sharp, P.A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. Nature reviews genetics 2002; 3:737-747.

[10] Randall G, Grakoui A, and Rice CM Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell

culture by small interfering RNAs. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 235-240.
[11] Robalino J, Almeida JS, McKillen D, Colglazier J, Trent HF 3rd, Chen YA, Peck ME, Browdy CL, Chapman RW, Warr GW, Gross PS. Insights into the immune transcriptome of the shrimp Litopenaeus vannamei: tissue-specific expression profiles and transcriptomic responses to immune challenge. Physiol Genomics. 2007 Mar 14;29(1):44-56.
[12] Robalino J, Ph.D., Antiviral immunity induced by double stranded RNA in a marine invertebrate. Medical University of South Carolina, 2006, 180 pags.
[13] The Marine Genomics Project http://www.marinegenomics.org/search.
[14] Huang, X. and Madan, A. (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.*, 9, 868-877 http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php
[15] EXPASY Proteomics Server http://www.expasy.ch/tools/dna.html.
[16] Basic Local Alignment Search Tool http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi.
[17] Snutch TP, Heschl MF, Baillie DL. The Caenorhabditis elegans hsp70 gene family: a molecular genetic characterization. Gene. Volume 64. Págs. 241-55 (1988).
[18] Cyr, D.M., Lu, X. and Douglas, M.G. Regulation of Hsp70 function by a eukaryotic DnaJ homolog. J. Biol. Chem. 267, 20927–20931 (1992).
[19] Feder, M.E. and Hofmann, G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annu. Rev. Physiol. 61, 243–282 (1999).
[20] Parsell, D.A. and Lindquist, S. (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. Annu. Rev. Genet. 27, 437–496.
[21] Zugel, U. and Kaufmann, S.H. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. Clin. Microbiol. Rev. 12, 19–39 (1999).
[22] Jayakumar, J., Suzuki, K., Sammut, I.A., Smolenski, R.T., Khan, M., Latif, N., Abunasra, H., Murtuza, B., Amrani, M. and Yacoub, M.H. Heat shock protein 70 gene transfection protects mitochondrial and ventricular function against ischemia reperfusion injury. Circulation 104, I303–I307 (2001).
[23] Supungul, P., Klinbunga, S., Pichyangkura, R., Hirono, I., Aoki, T. & Tassanakajon, A. Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach. DisAquat Organ 61, 123–135, (2004).
[24] Somboonwiwat, K., Marcos, M., Tassanakajon, A., Klinbunga, S., Aumelas, A., Romestand, B., Gueguen, Y., Boze, H., Moulin, G. & Bache` re, E. Recombinant expression and anti-microbial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Dev Comp Immunol 29, 841–85, (2005).
[25] Beale, K. M., Towle, D. W., Jayasundara, N., Smith, C. M., Shields, J. D., Small, H. J. & Greenwood, S. J. Anti-lipopolysaccharide factors in the American lobster *Homarus americanus*: molecular characterization and transcriptional response to Vibrio fluvialis challenge. Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics 3, 263–269, (2008).
[26] Liu, H., Jiravanichpaisal, P., Söderhäll, I., Cerenius, L. and Söderhäll, K., 2006. Antilipopolysaccharide factor interferes with White Spot Syndrome Virus replication in vitro and in vivo in the crayfish Pacifactacus leniusculus. Journal of virology 80 (21), 10365 – 10371.
[27] Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. Cell. 2006 Jun 16; 125 (6) :1111-24.
[28] Kedde M, Strasser MJ, Boldajipour B, Oude Vrielink JA, Slanchev K, Sage C, Nagel R, Voorhoeve P. M., van Duijse J, Ørom U. A, Lund A. H., Perrakis A., Raz E., Agami R. RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. Cell 131:1273–86 (2007).
[29] Southan C. A genomic perspective on human proteases as drug targets. Drug Discov Today 2001.
[30] Wolf M, Clark-Lewis I, Buri C, Langen H, Lis M, Mazzucchelli L. "Cathepsin D specifically cleaves the chemokines macrophage inflammatory protein-1 alpha, macrophage inflammatory protein-1 beta, and SLC that are expressed in human breast cancer". Am. J. Pathol. 162 (4): 1183–90 (April 2003).
[31] Barrett A.J., Rawlings ND, Woessner JF. The Handbook of Proteolytic Enzymes, 2nd ed. Academic Press, 2003.
[32] Hall A., Karplus Andrew P. and Poole L. B. Typical 2-Cys Peroxiredoxins: Structures, mechanisms and functions.FEBS J. 2009 May ; 276(9): 2469–2477.