

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



Nanocontenedores de dsRNA VP28 incorporados en el alimento, como terapia antiviral para combatir el virus de la mancha blanca (WSSV) en camarón *P. vannamei*

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

ELENA ANDREA RUIZ GUERRERO

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO DICIEMBRE DE 2021

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA**

**NANOCONTENEDORES DE dsRNA VP28 INCORPORADOS EN EL ALIMENTO,
COMO TERAPIA ANTIVIRAL PARA COMBATIR EL VIRUS DE LA MANCHA
BLANCA (WSSV) EN CAMARÓN *P. vannamei***

T E S I S

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

ELENA ANDREA RUIZ GUERRERO

Aprobada por:

Dra. Ivone Giffard Mena
Director de tesis

Dra. María Teresa Viana Castrillón
Sinodal

Dr. Samuel Sánchez Serrano
Sinodal

Dr. Santiago Ramos Carreño
Sinodal

Dedicatoria

Este trabajo al igual que muchos de los logros en mi vida se los dedico a mi familia, en especial a mi mamá y mi tío Roberto, quienes me alentaron a cumplir mis sueños, metas y objetivos a pesar de las implicaciones que conllevan. Por su apoyo incondicional, consejos, paciencia y amor.

¡Gracias!

En memoria de tres personas importantes en mi vida que fallecieron durante el desarrollo de este trabajo, sin embargo el amor que tengo por ellos jamás desaparecerá.

A mi hermano Roberto quien fue privado de la libertad y la vida, él me enseñó a no rendirme, aún en los momentos de mayor dificultad.

A mi tía Gaby quien perdió su batalla contra el cáncer y me dejó un inmenso amor por el mar, mi arquitecta con alma de bióloga marina.

A mi abuela que tanto quiero y extraño.

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California, por brindarme la oportunidad y herramientas para realizar mis estudios de maestría en dicha institución.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento otorgado a través de la beca de manutención (No. 744128)

En especial A la Dra. Ivone Giffard, por permitirme llevar a cabo este proyecto, aceptarme en su equipo de trabajo, en el cual las propuestas realizadas no quedaron en palabras. Por todo lo que me ha enseñado desde el inicio y por ser una parte fundamental de mi formación tanto profesional como personal. Gracias por motivarme a seguir adelante.

Al comité de tesis por todos sus consejos y apoyo incondicional, a la Dra. María Teresa Viana y su equipo de trabajo por abrirme las puertas de su laboratorio, así como, por el apoyo, tiempo y los consejos brindados, al Dr. Santiago Ramos por sus múltiples consejos, ideas y tomarse el tiempo para resolver mis dudas e inquietudes y al Dr. Samuel Sánchez por las enseñanzas y su confianza.

Al Dr. Alfredo Nuñez y Dr. Rubén Cadena del CENyN por su tiempo y ayuda en la elaboración de las VLPs, al Dr. Mario Gálaviz, sin su ayuda para la obtención de post larvas, la presente tesis no hubiese sido posible. A Carolina Ortega y Fernando Mata por su apoyo durante la realización de los bioensayos, Aurora Tinajero por su ayuda en la preparación de las dietas, a Jazmín Cervantes por su colaboración en la elaboración de las NPQ, al Dr. José Antonio Mata por su disponibilidad para compartir los equipos de trabajo.

A Astrid Espino técnica en el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), por su colaboración en la realización de los análisis qPCR.

Al Dr. Pierrick Fournier por haberme brindado un espacio en el laboratorio para realizar la toma de las fotografías para histología incluidas en la presente tesis.

A mis amigos por siempre estar cuando necesite una palabra de aliento o ser escuchada, Cecilia, Ana, Andy, Chantal, Gina, Adriana, Ivone, Vita, Liz, Kass, Julio, Víctor, Marce, Yess. A Christopher Corona, mi pareja por apoyarme en mis sueños y acompañarme en esta aventura con todo lo que implicaba.

A la Dra. Natalie Millán por su inmensa ayuda y paciencia, sin duda una excelente maestra a quien aprecio. Por último, quiero agradecer a todas las personas que de alguna u otra forma colaboraron e impulsaron el desarrollo del presente trabajo.

Índice de Figuras

Figura 1. Morfología de los viriones del virus de la mancha blanca	2
Figura 2. Modelo del mecanismo de acción de RNA de interferencia.....	3
Figura 3. Descripción gráfica del diseño experimental.....	17
Figura 4. Descripción gráfica del procedimiento para tinción por el método Hematoxilina-Eosina.	24
Figura 5. Análisis de ensamblaje de VLP-dsRNAvp28 mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.	25
Figura 6. Análisis de dispersión de luz dinámica (DLS).	26
Figura 7. Efectividad de los tratamientos anti WSSV.....	28
Figura 8. Amplificación por PCR de Punto final de Actina y vp28.....	29
Figura 9. Curva estándar para qPCR	30
Figura 10. Curva de amplificación por qPCR de vp664	31
Figura 11. Comparación de la sobrevivencia media y la carga viral de organismos del primer bioensayo desafiados con WSSV y tratados con dsRNAvp28.....	33
Figura 12. Comparación de la sobrevivencia media y la carga viral de organismos del segundo bioensayo desafiados con WSSV y tratados con dsRNAvp28.....	34
Figura 13. Histología del virus de la mancha Blanca (WSSV) en <i>P. vannamei</i> (organismos sobrevivientes al concluir el segundo bioensayo) basado en el método de tinción H&E.	36

Índice de tablas

Tabla 1. Ingredientes de la dieta preparada para los diversos tratamientos	14
Tabla 2. Abreviaturas utilizadas para los distintos tratamientos.....	19

Lista de Abreviaturas

ARNi: RNA de interferencia

BMV: Virus del mosaico del Bromo

CT: Umbral de ciclo o cycle threshold

Dpi: Días post infección

dsRNA: RNA de doble cadena

Hpi: Horas post infección

VLP: Partículas similares a un virus (Por sus siglas en inglés).

NPQ: Nanopartículas de quitosano

WSSV: Virus de la mancha blanca

Índice

I. Introducción y Marco Teórico	1
1.1 Introducción	1
1.2 Hipótesis	6
1.3 Objetivos	7
1.3.1 Objetivo general	7
1.3.2 Objetivos particulares	7
II. Materiales y Métodos	8
2.1 Obtención y mantenimiento de los organismos	8
2.2 Elaboración de Nanocontenedores de dsRNA e incorporación de los tratamientos para suministrar vía oral.....	9
2.2.1 Partículas similares a un virus (VLPs o Virus Like Particles en inglés)	9
2.2.1.1 Producción y Purificación del BMV	9
2.2.2.2 Síntesis y diálisis.....	10
2.2.2 Nanopartículas de Quitosano (NPQ).....	11
2.2.2.1 Solución de Quitosano y síntesis de nanopartículas.....	11
2.2.3 Elaboración e incorporación de los nanocontenedores de dsRNAvp28 mezclados en el alimento.....	12
2.2.4 Elaboración de la dieta e incorporación de los nanocontenedores de dsRNAvp28 adheridos en la cubierta del alimento	13
2.3 Desarrollo de los bioensayos	15
2.3.1 Preparación del Inóculo Viral e infección intramuscular (IM)	15
2.3.2 Infección Per os	15
2.3.3 Descripción de los sistemas para realizar los bioensayos.....	16
2.3.4 Desarrollo experimental Bioensayo 1.....	16
2.3.5 Desarrollo experimental Bioensayo 2.....	17
2.3.6 Muestras y almacenamiento	18
2.3.7 Análisis estadístico de las curvas de supervivencia	20
2.4 Análisis molecular.....	20
2.4.1 Extracción de ADN	20
2.4.2 Reacción en cadena polimerasa PCR de Punto Final	21
2.4.3 Determinación de carga viral mediante PCR Tiempo Real (qPCR).....	22

2.4.3.1 Curva estándar para cuantificación absoluta	22
2.5 Histología	22
III. Resultados	25
3.1 Síntesis y caracterización de nanopartículas VLPs-dsRNAvp28	25
3.2 Supervivencia de camarones desafiados con WSSV y tratados con dsRNAvp28 incorporado en el alimento.	27
3.3 Evaluación de calidad de las extracciones de ADN y eficiencia de amplificación de las muestras para su posterior cuantificación.	29
3.4 Evaluación de carga viral y efectividad de los distintos tratamientos contra el WSSV	30
3.5 Evaluación de la presencia de cuerpos de inclusión viral en organismos <i>P. vannamei</i>	35
IV. Discusión	37
V. Conclusiones.....	41
VI. Perspectivas	43
Referencias.....	44

I. Introducción y Marco Teórico

1.1 Introducción

La acuicultura se ha convertido a nivel mundial en una de las industrias más importantes para la seguridad alimentaria. Según los datos reportados por la FAO en 2018, los crustáceos de cultivo representan el 11% del volumen total de la producción acuícola. Siendo *Penaeus vannamei* la especie más cultivada en una industria, valorada en aproximadamente 30 mil millones de dólares USD. Por lo general los cultivos de camarón se realizan con altas densidades, en busca de su intensificación, aunado a la movilización de larvas y de reproductores entre los diversos laboratorios y granjas de cultivo de camarón, ha propiciado la diseminación de éste y otros patógenos (Millard et al., 2021). Se estima que el 40% de la producción de camarón (> \$ 3 mil millones) se pierde anualmente, principalmente debido a patógenos virales (Stentiford et al., 2012). Es importante señalar que el porcentaje de pérdidas debido a la presencia de patógenos virales es tres veces mayor que las pérdidas a causa de enfermedades bacterianas (Flegel, 2012; Millard et al., 2021).

El virus del síndrome de la mancha Blanca (WSSV, por sus siglas en inglés) es un patógeno que desde su diseminación, a mediados de los 90's en diversos países de América (Escobedo-Bonilla et al., 2008; Lightner, 2011), ha causado grandes pérdidas económicas (Stentiford, 2012; Lightner et al., 2012). Su alta virulencia, rápida propagación (3 a 10 días) y alta mortandad (90% al 100%), ha impactado a todos los países productores de camarón. El WSSV se puede transmitir a través de rutas horizontales y verticales (Lo et al., 1997; Soto y Lotz, 2001). Las rutas horizontales incluyen la alimentación oral de tejidos de organismos infectados o alimentos contaminados por el tracto digestivo, exposición directa de las branquias a partículas de virus; las rutas verticales se refieren principalmente a la infección vía transovárica (Lo et al., 1997; Soto y Lotz, 2001).

El WSSV es un virus de ADN de doble cadena (dsDNA) con un genoma de aproximadamente 300 mil pares de bases (kbp)(Yang et al., 2001), catalogado como virus gigante (Filee y Chandler, 2008). Filogenéticamente, el WSSV difiere de todos los demás grandes virus de dsDNA en

invertebrados (Lo et al., 2012) asignado como único miembro del género *Whispoviurs* en la familia *Nimaviridae* (Vlak et al., 2005). Las partículas de WSSV se caracterizan por su forma ovoide a baciliforme (Lo et al., 2012), así como también, por la presencia de un filamento en el extremo del virión, denominado “nima” (Williams et al., 2016), cuenta con seis principales proteínas estructurales: VP15 y VP664 en la nucleocápside, VP24 y VP26 en el tegumento, mientras que VP19 y VP28 forman parte de la envoltura, donde los números se refieren a la masa de cada proteína (van Hulten et al., 2000; van Hulten et al., 2001b; van Hulten et al., 2002; Tsai et al., 2006).

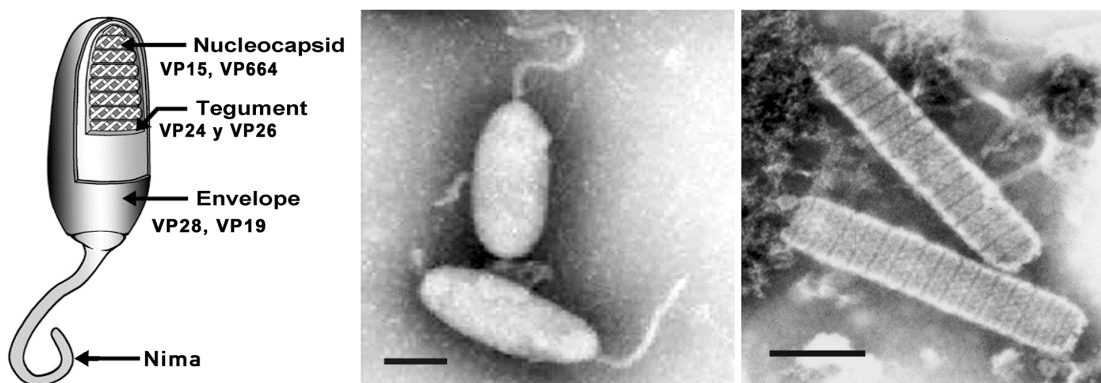


Figura 1. Morfología de los viriones del virus de la mancha blanca. (Izquierda) estructura de un virión típico de *Whispovirus* utilizando una sección cortada para mostrar la ubicación de las proteínas principales. (Imagen central y derecha) Micrografías electrónicas de contraste negativo de los viriones del WSSV, las barras representan 100 nm. (Tomado y modificado de Wang et al., 2019).

Los camarones carecen de sistema inmune adaptativo (dificultando el desarrollo de vacunas en el concepto clásico de la palabra), sin embargo, cuentan con mecanismos de respuesta innata que los protege contra patógenos (Flegel and Sritunyalucksana, 2011). En este contexto surge la necesidad de entender y estudiar el sistema inmunológico de los camarones, en conjunto con los mecanismos de defensa del camarón y de protección utilizados en producción para combatir infecciones virales. El silenciamiento del ARNm endógeno homólogo a través de mecanismos de ARN de interferencia (ARNi) se perfila como una herramienta eficaz para combatir enfermedades virales del camarón. La activación de respuestas antivirales de ARNi mediante la administración de ARN exógeno de doble cadena (dsRNA) específico para los genes de la proteína de la cápside viral ha producido una protección considerable contra las infecciones virales (Mejía-Ruíz et al., 2011; Nilsen et al., 2017).

Las proteínas estructurales de WSSV como VP28 y VP26 están involucradas en la entrada del virus (Van Hulten et al., 2001; Tang et al., 2007; Youtong et al., 2011). A partir de los resultados del estudio realizado por Chang et al. (2010) y con las interacciones previamente establecidas, se sentaron los principios de la relación entre las distintas proteínas de WSSV en el que VP24 actúa como una proteína central que se asocia directamente con VP26, VP28, VP38A, VP51A y WSV010 para conformar un complejo proteico asociado a la membrana. VP19 y VP37 se unen a este complejo mediante asociación con VP51A y VP28, respectivamente. A través de la interacción VP26-VP51C, este complejo de envoltura se ancla a la nucleocápside, que está formada por capas de anillos formados por VP664. La proteína VP28 y VP26 son de las más abundantes de la envoltura del virus de WSSV (Tang et al., 2007). Dicha proteína es crucial durante la etapa inicial de la infección, siendo capaz de unirse a los receptores de las células huésped permitiendo la entrada del virus al citoplasma para iniciar el proceso infeccioso (Yi et al., 2004). Se ha demostrado que el dsRNA VP28 puede ser un tratamiento potencial para conferir protección a los camarones y combatir la infección por WSSV (Chandrika y Puthiyedathu, 2021).

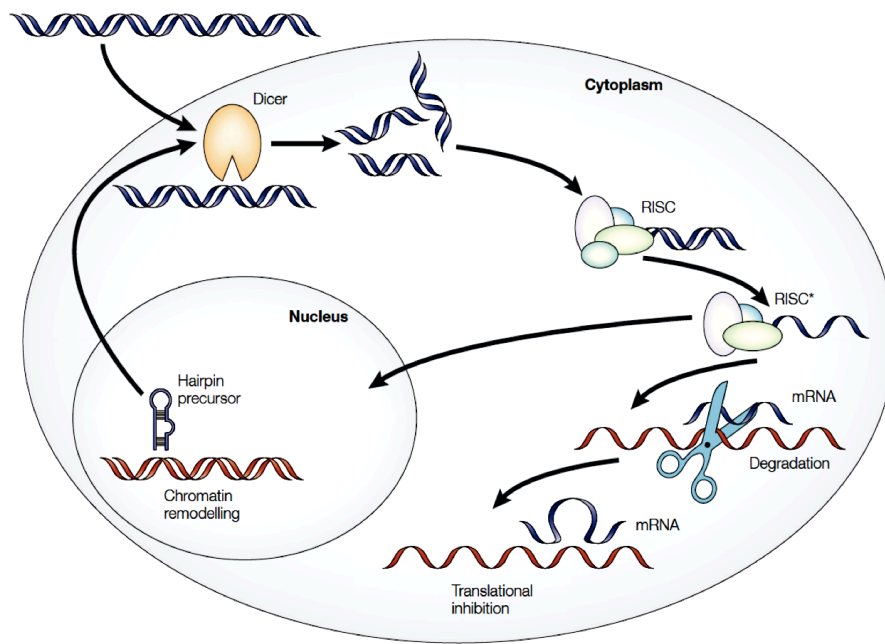


Figura 2. Modelo del mecanismo de acción de RNA de interferencia. (Tomado y modificado de Wasi, 2003).

El sistema de ARNi es un mecanismo postranscripcional mediante el cual una molécula de dsRNA es introducida a la célula, se basa en el corte de RNA de doble cadena (dsRNA) por la enzima DICER en fragmentos más pequeños de entre 21 a 23 nucleótidos de longitud. Esta enzima corta al dsRNA, generando dos tipos de RNAs: pequeños RNAs de interferencia (siRNAs) y micro RNAs (miRNAs). La interacción de miRNA en el mecanismo de interferencia se traduce en la inhibición de la transcripción, mientras que siRNA es entregado por DICER a un complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC, por sus siglas en inglés RNA induced silencing complex) que utiliza la cadena anti-sentido del siRNA para unirse y actúa degradando el RNAm, por tanto, silenciando el gen de interés (Wasi, 2003). Este es un mecanismo protector innato de hospederos eucariotas contra infecciones virales (Chandrika y Puthiyedathu, 2021).

Una de las primeras evidencias de la existencia de un sistema de defensa antiviral específica en camarones, mediante la activación del sistema de interferencia (RNAi) fue demostrada por Robalino et al. (2005) en organismos *P. Vannamei*. Respecto a este tipo de tratamientos es importante considerar que la activación del sistema de interferencia (RNAi) depende de la entrada del dsRNA en la célula de *P. vannamei* y por lo tanto se debe garantizar que, por vía oral, estos RNA sean entregados en los órganos diana sin ser degradados. Aunque el dsRNA puede ser utilizado sin un adyuvante, su eficacia de protección se ha mejorado con el uso de sistemas de administración mediante nanopartículas de quitosano (Sarathi et al., 2008) y liposomas catiónicos (Apiratikul et al., 2013; Sanitt et al., 2016), que interactúan con las membranas celulares a través de sus cargas positivas externas.

Particularmente, el quitosano cuenta con diversas características que lo convierten en un material ideal para la construcción de nanopartículas de uso terapéutico (Croisier y Jérôme, 2013). Es un polisacárido biodegradable natural extraído del exoesqueleto de crustáceos (Croisier y Jérôme, 2013; Ufaz et al., 2018), y se ha demostrado que no es tóxico en animales de experimentación (Rao y Sharma, 1997), ni en humanos. Además, se ha evidenciado que este polímero se une eficazmente al ADN en solución salina o de ácido acético y protege parcialmente el ADN de la degradación por nucleasas (Richardson et al., 1999). Las nanopartículas de quitosano son partículas sólidas coloidales con un tamaño entre 1 y 1000 nm, con propiedades fisicoquímicas

interesantes en relación a tamaño, estabilidad, adsorción, alta reactividad y facilidad de alcanzar los tejidos u órganos diana (Carmona et al., 2018). Ufaz et al. (2018), utilizaron nanopartículas de quitosano modificadas para transportar anti-Rab 7 y anti-Rab VP28 con la finalidad de evaluar la capacidad para regular negativamente la expresión génica, concluyendo que existe una protección significativa contra la infección viral causada por WSSV en *P. vannamei*.

Recientemente se han utilizado nanocontenedores modificables y ensamblados de forma controlable derivados de proteínas de la cápside viral llamadas partículas similares a virus (VLP, por sus siglas en inglés). Este tipo de partículas imitan la estructura general de un virión nativo, pero carecen de los materiales genómicos para su replicación y se han utilizado para encapsidar dsRNA y silenciar genes específicos del virus de la mancha blanca, como por ejemplo VP28 (Itsathitphaisarn et al., 2017).

Estudios realizados, revelaron que las VLP de *Macrobrachium rosenbergii nodavirus* (MrNV) encapsulando la proteína (VP28) de la envoltura del virus de la mancha blanca, pueden detener las infecciones causadas por WSSV cuando se administran mediante inyección intramuscular (IM) en camarones infectados (Jariyapong et al., 2014). Por otra parte, en un estudio reciente se utilizó como nanocontenedor de dsARN de interferencia sintetizado a partir de la proteína VP28 del WSSV, VLPs derivadas del virus del moteado clorótico del caupí (CCMV) para combatir el WSSV, reportando supervivencias del 100% de los camarones que recibieron la terapia antiviral mediante inyección IM y 40% de supervivencia administrando por vía oral el tratamiento adherido al alimento pelletizado con el aglutinante Dry Oil (Ramos-Carreño et al., 2021).

A diferencia de las cápsides provenientes de virus que infectan animales, el uso de virus de plantas, tiene como atributos adicionales la biocompatibilidad y la falta de actividad patógena en humanos y animales, convirtiéndose en una de las mejores opciones para encapsidar compuestos biológicos (Srtugala et al., 2021; Zhang et al., 2018; Ramos-Carreño et al., 2021). El virus del mosaico del Bromo (BMV) es uno de los virus vegetales más estudiados, su genoma está compuesto por RNA monocatenario y viriones esféricos sin envoltura, su tamaño es de aproximadamente 28 nm dependiendo de las condiciones circundantes, y muestra una simetría

icosaédrica T=3 (Lucas et al., 2002; Srtugala et al., 2021). En 2019 se realizó un estudio para evaluar la internalización de siRNA contra el oncogén Akt1 en VLPs de BMV y CCMV, demostrando que la eficiencia de confinamiento de siRNA en VLPs de BMV es 10 veces mayor que lo reportado para VLPs de CCMV (Nuñez-Rivera et al., 2020).

En este estudio utilizamos nanopartículas elaboradas a base de quitosano y VLPs procedentes del virus del mosaico del bromo (BMV, por sus siglas en inglés), conteniendo dsRNA dirigido contra el gen VP28 e inhibir la replicación del virus de la mancha blanca (WSSV) en *P. Vannamei*.

1.2 Hipótesis

Al suministrar los tratamientos antivirales, vía oral incorporados al alimento en los nanocontenedores a base de quitosano y las partículas similares a un virus (VLPs) de BMV, se obtiene una sobrevivencia mayor o igual al 60% respecto a los camarones infectados con WSSV.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar la protección de nanocontenedores de dsRNA elaborados a partir de Partículas similares a virus (VLP) y nanopartículas de quitosano, suministrados vía oral en el alimento (pellet) para combatir la infección ocasionada por el virus de la mancha blanca (WSSV), mediante el silenciamiento génico de VP28 en juveniles de camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*).

1.3.2 Objetivos particulares

1. Elaborar nanocontenedores, VLPs derivadas del BMV (Virus del mosaico del Bromo) y nanopartículas de quitosano para encapsidar dsRNA_{VP28} e incorporarlo en el alimento tipo pellet.
2. Evaluar la eficacia de los nanocontenedores de dsRNA_{VP28} y su funcionamiento como tratamiento contra el WSSV administrado vía oral en el alimento (pellets), mezclado y/o adherido en la cubierta del pellet, mediante la realización de bioensayos.
3. Comparar el efecto de las VLP-dsRNA_{VP28} y NPQ del tiempo de sobrevivencia y la carga viral en camarones desafiados con WSSV.
4. Demostrar la capacidad protectora de ambos tratamientos a nivel tisular, mediante análisis histológico.
5. Identificar el nanocontenedor que ofrezca la mayor ventaja en la entrega del tratamiento anti-WSSV, mediante el análisis de los resultados de sobrevivencia final, carga viral e histología.

II. Materiales y Métodos

Este trabajo se divide en 5 apartados principales:

1. Obtención y mantenimiento de los organismos.
2. Elaboración de nanocontenedores de dsRNA_{v28} e incorporación de los tratamientos para suministrar vía oral.
3. Desarrollo de los bioensayos, se describen los sistemas utilizados, el mantenimiento de los juveniles, así como también, la preparación de los distintos inóculos virales, el suministro de los diferentes tratamientos, la colecta y almacenamiento de los organismos.
4. Análisis molecular, se encuentran descritas las técnicas moleculares utilizadas desde la extracción de ADN hasta la metodología para evaluación de la carga viral.
5. Análisis histológico de hepatopáncreas en organismos *P. vannamei* desafiados con WSSV.

2.1 Obtención y mantenimiento de los organismos

Las post-larvas (PL's) de camarón (peso promedio 0.6 gramos) para la realización de los dos bioensayos fueron proporcionadas por el Dr. Mario Galaviz (procedentes del Laboratorio SAHIMAR, El Rosario, Sinaloa), los organismos se transportaron del invernadero de Biotecnología de crustáceos de la Facultad de Ciencias Marinas al Laboratorio de Patología Experimental Acuícola (LPEA) en cubetas de 20 L con agua de mar a 33 ppm y 25 °C, colocándolos para su aclimatación en estanques circulares de 2,500 L con agua de mar previamente filtrada mediante un filtro de arena, 3 cartuchos en serie de 10 µm, 5 µm y 5 µm, con aeración. Los parámetros fisicoquímicos se mantuvieron constantes: oxígeno >5 mg/L, pH 7.8 ± 0.3 y temperatura 26.5 °C ±1.5 °C. Para alcanzar una temperatura de 28 °C, fue necesario incrementar la temperatura 1 °C por día durante 3 días y la salinidad se mantuvo en 33 ppm durante toda la etapa de aclimatación.

Las post-larvas de aproximadamente 0.6 gramos, se alimentaron con pellets elaborados en el Laboratorio de Nutrición Acuícola del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO), de acuerdo con las proporciones señaladas en la Tabla 1, suministrando el 5% de la biomasa del peso promedio de los organismos, dividido en dos raciones por día. Dichas PL's se mantuvieron hasta alcanzar la etapa juvenil para realizar los bioensayos.

2.2 Elaboración de Nanocontenedores de dsRNA e incorporación de los tratamientos para suministrar vía oral

2.2.1 Partículas similares a un virus (VLPs o Virus Like Particles en inglés)

El proceso para la elaboración de las VLPs consta de dos etapas principales: a) producción y purificación del virus del Mosaico del Bromo (BMV) b) Síntesis y diálisis de las partículas (VLPs). La producción y purificación del virus fueron realizados en las instalaciones del CNYN-UNAM por el Dr. Alfredo Nuñez. A partir de los extractos de virus, se realizó la síntesis y diálisis en el Laboratorio de Ecología Molecular de la FCM-UABC de acuerdo con el protocolo estándar (Nuñez-Rivera et al., 2020). Se utilizó dsRNA de VP28 (dsRNAvp28), basado en la secuencia VP28 de WSSV (GenBank: EU931451.1) (Ramos-Paredes et al., 2011). El dsRNAvp28 se adquirió en empresa AgroRNA / Genolution (Corea del Sur).

2.2.1.1 Producción y Purificación del BMV

El BMV se obtuvo a partir de la inoculación de plantas de cebada con el virus, para ello fue necesario realizar la siembra de cebada (aprox. 10 semillas /maceta), utilizando tierra enriquecida con fertilizante. Una vez germinada la planta, se dañó mediante una ligera abrasión mecánica para realizar la infección con el virus, usando el buffer de inoculación (fosfato de sodio 0.01 M, pH 6 y 0.01 M cloruro de magnesio) conteniendo 0.1 µg/µL de suspensión de virus nativo. Después de que las plantas mostraron síntomas de infección (clorosis), las hojas se colectaron, y se molieron en una licuadora en buffer de extracción de virus (acetato de sodio 0.5 M y acetato de magnesio 0.08 M, pH 4.5). La mezcla se filtró a través de una gasa y luego se añadió 1 volumen de cloroformo y se mantuvo en agitación a 4°C durante 4 horas. Para recuperar la fase acuosa, la mezcla se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa se mantuvo bajo agitación durante 2 horas y se colocó en un colchón de sacarosa al 10%, para separar la fracción de proteína. El colchón se ultracentrifugó a 30,000 rpm durante 120 min. El sedimento formado se resuspendió en buffer de suspensión de virus y el virus se ultrapurificó usando un gradiente de 5-40% de sacarosa, y se ultracentrifugó a 30,000 rpm a 4°C durante 120 min. Finalmente, los virus purificados se almacenaron a -80°C (Nuñez-Rivera et al., 2020).

La proteína de la cápside fue purificada a partir del desensamble de los virus (BMV), a una concentración elevada de sales y un pH mayor a 7. El buffer de desensamble (0.5 M CaCl_2 , 0.05 M Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1mM DTT, 0.5 mM PMSF) permite el desensamble del virus. Al contener iones de calcio el buffer, permite que el RNA se una al Ca_2^+ , promoviendo su precipitación, y facilitando su remoción mediante ultracentrifugación. La solución de virus purificado se colocó en una membrana de diálisis de celulosa previamente esterilizada, con un tamaño de poro de 8,000 a 12,000 Da, en buffer de desensamble por 24 h a 4°C, con agitación lenta. La solución de virus purificado se colocó en una membrana de diálisis de celulosa previamente esterilizada (tamaño de poro de 8,000 a 12,000 Da), en buffer de desensamble en durante 24 h a 4°C, con agitación lenta. Una vez transcurrido este tiempo se retiró la solución de la membrana de diálisis y se colocó dentro de un tubo ultra claro de ultracentrífuga. El volumen final de la solución en el tubo fue de 1.2 mL. Se centrifugó a 29,0420 x g por un periodo de 126 min a 4 °C en un rotor 90 Ti en la ultracentrífuga Beckman XPN100. Inmediatamente finalizada la ultracentrifugación se extrajo la solución en fracciones de 300 μL , de arriba hacia abajo, cuidando de no perturbar la solución, y se mantuvo a 4°C. Después se midió la pureza y la concentración de cada fracción en un espectrofotómetro UV-Vis (modelo Nanodrop marca Thermo Scientific), manteniéndolo a 4 °C, y desechando aquellas fracciones que no tenían la pureza mínima de 99.5%, es decir, la relación obtenida de las absorbancias en los puntos característicos de la proteína y los ácidos nucleicos (A280/A260) debe ser igual o mayor a 1.5. Las fracciones con una pureza igual o mayor a 1.5 y con A280 mayor a 0.08 se mezclaron para posteriormente dializarse 12 h en buffer de proteína (1 M NaCl, 0.02M Tris-HCl pH 7.2, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF). Finalmente se midió la concentración y pureza de la proteína, y se almacenó a 4°C (Nuñez-Rivera et al., 2020).

2.2.2.2 Síntesis y diálisis

Las VLPs del BMV se sintetizaron utilizando una relación de masa de 1:7 (dsRNA:CP), para ello se mezclaron la proteína de la cápside desensamblada y el dsRNAVP28 (2,177 μL de CP + 250 μL dsRNA-VP28 + 9,239.5 μL de Buffer = 11,666.5 μL), dando como resultado 2 alícuotas de un volumen final de 23,333 mL. Dicho volumen se colocó y distribuyó en membranas de diálisis, las cuáles fueron acomodadas en un recipiente con 5 L de Buffer de ensamble (NaCl 50 mM, KCl 10 mM, MgCl_2 5 mM, DTT 1 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7.2). Al finalizar, el contenedor (Buffer +

membranas) se colocaron sobre una plancha de agitación magnética a 4°C por 24 horas. Se prepararon 5 L de Buffer de acidificación (50 mM acetato de sodio, 8 mM acetato de magnesio, pH 4,5), filtrado previamente por 0.2 μm . Posteriormente se decantó el buffer de ensamble y se añadieron en el mismo recipiente que contenía las membranas, los 5 L del buffer de acidificación. El contenedor (Buffer + membranas) fue colocado sobre una plancha de agitación magnética a 4°C por 12 horas (Nuñez-Rivera et al., 2020). Finalmente se colectó con especial cuidado el contenido de cada membrana en un tubo Falcón de 50 mL y se cuantificó la concentración de dsRNA en Nanodrop, obteniendo VLPs a una concentración de 77.3 ng/ μL .

2.2.2 Nanopartículas de Quitosano (NPQ)

Para la elaboración de las nanopartículas de quitosano se realizó un procedimiento de gelación iónica (Calvo et al., 1997), la cual está basada en las interacciones iónicas entre los grupos aminos cargados positivamente del quitosano y los grupos cargados negativamente de un polianión, en este caso el tripolifosfato de sodio (TPP), siendo el agente iónico reticulador más ampliamente utilizado, debido a su capacidad de gelificar de manera rápida y a la ausencia de un efecto tóxico (Calvo et al., 1997; De Moura et al., 2009., Carmona et al., 2018).

Con base en lo anterior y siguiendo el principio del modelo de Poseidón diseñado por Boeshaghi et al., (2019), el cual originalmente es un sistema controlado de goteo automático, que cuenta con un microscopio para examinar el dispositivo de microfluídica durante su operación. En este trabajo se utilizó una jeringa de insulina haciendo el goteo de forma manual, con la finalidad de una alternativa al modelo. Esencialmente el procedimiento se divide en dos partes: A) Preparación de la solución de quitosano; B) síntesis de las nanopartículas.

2.2.2.1 Solución de Quitosano y síntesis de nanopartículas.

Para la elaboración de la solución de quitosano se realizó una disolución de quitosano (300 mL) 0.25% (w/v) en 2% (v/v) de ácido acético en agua grado molecular y se dejó en agitación por 25 horas. La solución fue centrifugada a 8,000 x g durante 15 minutos a 4 °C, recuperando el sobrenadante, el cual se centrifugó a 11,000 x g durante 20 minutos a 4 °C. El pH se ajustó a 4.5 con NaOH, filtrando la solución obtenida al vacío con 4 filtros Whatman en serie (11, 6, 1.2 y 0.45

μm). Finalmente, la solución fue refrigerada hasta realizar la síntesis de las nanopartículas. Para la síntesis de las Nanopartículas de Quitosano (NPQ) se añadieron 5 mL de esta solución de quitosano en un vaso de precipitado de 50 mL, manteniendo la solución sobre una plancha magnética en agitación constante por 10 minutos. Con ayuda de una jeringa de insulina, se añadieron por goteo en la solución anterior 400 μL como volumen final correspondiente a 118.5 μL de dsRNA a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, diluido en 281.5 μL de agua MiliQ, manteniendo en agitación por 15 minutos. Durante ese tiempo se elaboró una solución de Tripolifosfato de sodio (TTP) al 0.25 % (w/v) y se agregó 1 mL de TTP por goteo (a la solución de quitosano) con una jeringa nueva, quedando en agitación durante una hora. Transcurrido el tiempo se añadieron 200 μL de glutaraldehído al 2.5% y se mantuvo en agitación una hora. Se centrifugó a 2,600 x g por 30 minutos a 4 °C (en una centrifuga BECKMAN COULTER, ALLEGRA™25) y se colectó el sobrenadante, centrifugándolo a 16,000 x g durante 1 hora a 4 °C. Todo el procedimiento a excepción de la centrifugación se realizó a temperatura ambiente (24°C). Se obtuvieron 1,950 μL de nanopartículas de quitosano a una concentración de 55.12 $\text{ng}/\mu\text{L}$, resultando en un 45% de eficiencia de encapsulación.

2.2.3 Elaboración e incorporación de los nanocontenedores de dsRNAvp28 mezclados en el alimento

El alimento (pellets) para los camarones se elaboró de forma manual, esto con la finalidad de evitar procesos que sometieran a presión o calentamiento el tratamiento de dsRNAvp28 encapsulado en los nanocontenedores. El procedimiento consistió en mezclar perfectamente los macronutrientes (ver Tabla 1), después se mezclaron los micronutrientes con los macronutrientes hasta conseguir uniformidad en los ingredientes. Se mezcló en un recipiente independiente 30.19% fécula de maíz (maicena) en agua tibia (por cada gramo de maicena se agregaron ≈ 1.2 mL de agua), posteriormente se calentó en el microondas hasta formar una pasta esponjosa para su completa gelatinización. Una vez elaborada la pasta, se añadió al recipiente de los macro y micronutrientes, mezclando hasta conseguir homogeneidad. Posteriormente se añadió aceite de pescado y soya en una proporción de 2%, todos los ingredientes se mezclaron hasta conseguir una masa homogénea. Para concretar la elaboración de la masa, se agregaron 6.5 mL de VLPs-dsRNAvp28 a una concentración de 77.3 $\text{ng}/\mu\text{L}$ en un tubo Falcón que contenía un 2% extra de

aceite de pescado, lo anterior con la finalidad de conseguir que los nanocontenedores fuesen distribuidos e incorporados homogéneamente en la masa. Una vez obtenida la masa se colocó en una bolsa plástica con un orificio (simulando una manga pastelera), para proceder a verter el contenido en una jeringa de 3 mL. Se retiró la aguja y con ayuda del embolo se elaboraron tiras de masa, las cuales se colocaron sobre aluminio. Se dejaron secar por 15 minutos a temperatura ambiente, cortando las tiras en fragmentos de ≈ 0.5 mm de longitud. Los pellets se dejaron secar por 24 horas. Por ultimo se preparó una solución de gelatina al 2%, colocando 1 mL de ésta por aspersión sobre 20 gramos pellets y se dejaron secar por 12 horas(todo el procedimiento de secado se realizó a temperatura ambiente).

El mismo procedimiento se realiza para elaborar los tratamientos con nanopartículas de quitosano (NPQ), la única variable es que el paso donde se agregaron los VLPs-dsRNAvp28, se incorporaron las NPQ. Se agregaron 1.9 mL de NPQ a una concentración 55.12 ng/ μ L para el bioensayo 1 y la concentración de las NPQ para el bioensayo 2 fue de 31.1 ng/ μ L.

2.2.4 Elaboración de la dieta e incorporación de los nanocontenedores de dsRNAvp28 adheridos en la cubierta del alimento

La preparación de este alimento consintió en la incorporación de los VLPs-dsRNAvp28 en forma de cubierta sobre el pellet previamente preparado, a continuación, se describe el procedimiento para su manufacturación.

En primera instancia se mezclaron perfectamente los macronutrientes (ver Tabla 1), después se procedió a mezclar los micronutrientes y macronutrientes hasta conseguir la uniformidad de los ingredientes. Se mezcló en un recipiente independiente 30.19% de fécula de maíz (maicena) en agua tibia (por cada gramo de maicena se agregaron ≈ 1.2 mL de agua), posteriormente se calentó en el microondas hasta formar una pasta esponjosa. Una vez elaborada la pasta, se añadió al recipiente de los macro y micronutrientes mezclando hasta conseguir homogeneidad. A continuación, se añadieron aceite de pescado y soya en una proporción del 2%, todos los ingredientes se mezclaron hasta conseguir una masa homogénea. Dicha masa se colocó en una bolsa plástica con un orificio (simulando una manga pastelera), para proceder a verter el contenido en una jeringa de 3 mL. Se retiró la aguja y con ayuda del embolo se elaboraron tiras de

masa, las cuales se colocaron sobre un aluminio. Se dejaron secar por 15 minutos a temperatura ambiente y se procedió a cortar las tiras en fragmentos de ≈ 0.5 mm de longitud. A continuación, se mezclaron los 6.5 mL VLPs-dsRNAvp28 a una concentración de 77.3 ng/ μ L en 2% de aceite de pescado y se rociaron con ayuda de un aspersor sobre los pellets previamente cortados. Se dejaron secar por 24 horas a temperatura ambiente. Se preparó una solución de gelatina al 2%, colocando 1 mL de ésta por aspersión sobre 20 gramos pellets y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 12 horas.

Tabla 1. Ingredientes de la dieta preparada para los diversos tratamientos (comunicación personal Viana – Castrillón 2020).

<i>Ingrediente</i>	Porcentaje	Tipo de Nutriente
<i>Harina de Soya</i>	15	Macronutrientes
<i>Harina de Ave</i>	20	
<i>Harina de Pescado</i>	12	
<i>Gluten</i>	8	
<i>Aceite de Soya</i>	2	Otros
<i>Aceite de Pescado</i>	2	
<i>Maicena</i>	30.19	
<i>Gelatina</i>	6	
<i>Rovimix (mezcla de vitaminas y minerales)</i>	2	Micronutrientes
<i>Stay C</i>	0.07	
<i>Colesterol</i>	0.5	
<i>DHA NATUR al 24%</i>	1	
<i>Benzoato de sodio</i>	0.23	
<i>BHT</i>	0.01	
<i>Fosfolípidos</i>	1	
<i>TOTAL</i>	100	

2.3 Desarrollo de los bioensayos

2.3.1 Preparación del Inóculo Viral e infección intramuscular (IM)

El inóculo viral se activó a partir de organismos infectados con un aislado de WSSV-Son 2008 PRJEB44096 (ERP128102) recuperados en estado moribundo y congelados a -80 °C. La preparación de todos los inóculos virales utilizados para el desarrollo de los distintos experimentos se realizó de acuerdo con la metodología de Prior et al. (2003). El procedimiento consistió en homogenizar 100 mg de branquias de 3 camarones positivos al WSSV en 900 µL de buffer TN (20 mM de Tris-HCl, 400 mM de NaCl, pH 7.4). Para posteriormente centrifugar el homogenizado a 1800 y 3000 x g durante 20 min cada vez a 4 °C. Enseguida se recuperó el sobrenadante con una jeringa de 3 mL sin extraer los restos del fondo, se colectó en un tubo nuevo que contenía 500 µL de buffer TN y se filtró la solución a través de una membrana de 0.45 µm (VWR®, Europe). Una vez obtenido el inóculo (dilución 1:1 p/v en buffer TN), se inyectó 20 µL en el quinto segmento abdominal de cada organismo sometido al desafío con el WSSV. Este mismo procedimiento se realizó para obtener el control negativo libre de WSSV, con la diferencia de que el tejido utilizado provenía de camarones no infectados con el virus.

2.3.2 Infección Per os

Para realizar la infección Per os fue necesario realizar la activación del inóculo y desafiar previamente con WSSV vía intramuscular (IM) a un grupo de camarones (n=21) libres de mancha blanca. Del grupo de camarones infectados, se seleccionaron aquellos colectados en estado moribundo, retirando el telson y el cefalotórax de cada organismo para obtener únicamente el músculo del segmento abdominal. Los segmentos se cortaron en fragmentos pequeños y se mezclaron para repartir a cada camarón como alimento el 3% de su biomasa con el tejido infectado. Este mismo procedimiento se realizó para obtener el control negativo libre de WSSV, con la diferencia de que el tejido utilizado provenía de camarones no infectados.

2.3.3 Descripción de los sistemas para realizar los bioensayos

Los organismos juveniles fueron ingresados al LPEA de la Facultad de Ciencias Marinas, el cual se encuentra dividido en dos zonas: una zona control, donde se realizaron los bioensayos con los organismos libres de WSSV y la zona de infección, en el cual se trabajó con los organismos desafiados con WSSV. Ambas zonas cuentan con seis sistemas de recirculación, cada sistema consta de un reservorio (55 L) para colectar el agua de 9 acuarios de vidrio con capacidad de 12 L cada uno, equipados con sistema de aireación, bombas de agua sumergibles (LIFEGARD, Quiet One 4000) y calentadores de titanio (Titanium Heater HMO-200, JSK Merchandising, Inc., Countryside, Illinois) para mantener la temperatura. Con la finalidad de conservar una buena calidad en el agua las heces y el alimento fueron removidos cada 2 días por sifoneo. Todos los materiales, utensilios y agua pasaron por un proceso de desinfección con hipoclorito de calcio granulado a 1600 ppm, neutralizado con 3 partes de tiosulfato de Sodio. Todo residuo en contacto con material biológico infeccioso fue esterilizado en autoclave (Mod. Stmel, Market Forge Ind. Inc. NY).

2.3.4 Desarrollo experimental Bioensayo 1

Una vez listos los sistemas y reactivado el aislado del virus se procedió a realizar el primer bioensayo, para el cual se utilizaron dos grupos de camarones como control positivo: un grupo (n=21 dividido en 3 repeticiones) desafiado vía intramuscular como se describió en la sección 2.3.1 (WSSV IM) y un grupo infectado de manera Per os como se explicó previamente (sección 2.3.2), un control negativo (C-) organismos libres de WSSV inyectados con una solución TN libre de virus y 8 grupos (n= 21) de organismos desafiados con WSSV vía Per os a los cuales se les suministró los distintos tratamientos anti-WSSV: dsRNAVP28 libre, VLP-dsRNAvp28 y nanopartículas de quitosano conteniendo dsRNAVP28, probados en distintos tiempos pre infección, simultaneo al desafío y post infección (ver figura 3). Los organismos que recibieron como terapia antiviral VLPdsRNAvp28 mezcladas en el alimento (sección 2.2.3). Los tratamientos vía oral fueron suministrados 6.0 µg/camarón/día en dos raciones de 3 µg para el caso de las VLPs, mientras que a los organismos que recibieron como terapia anti WSSV nanopartículas de quitosano conteniendo dsRNAvp28, la dosis utilizada fue de 3 µg/camarón/día suministrado en dos raciones de 1.5 µg. Los parámetros fisicoquímicos se mantuvieron constantes: oxígeno >5 mg/L, pH 7.8 ± 0.3, temperatura 28.0 ± 0.5 °C y una salinidad de 33 ppm.

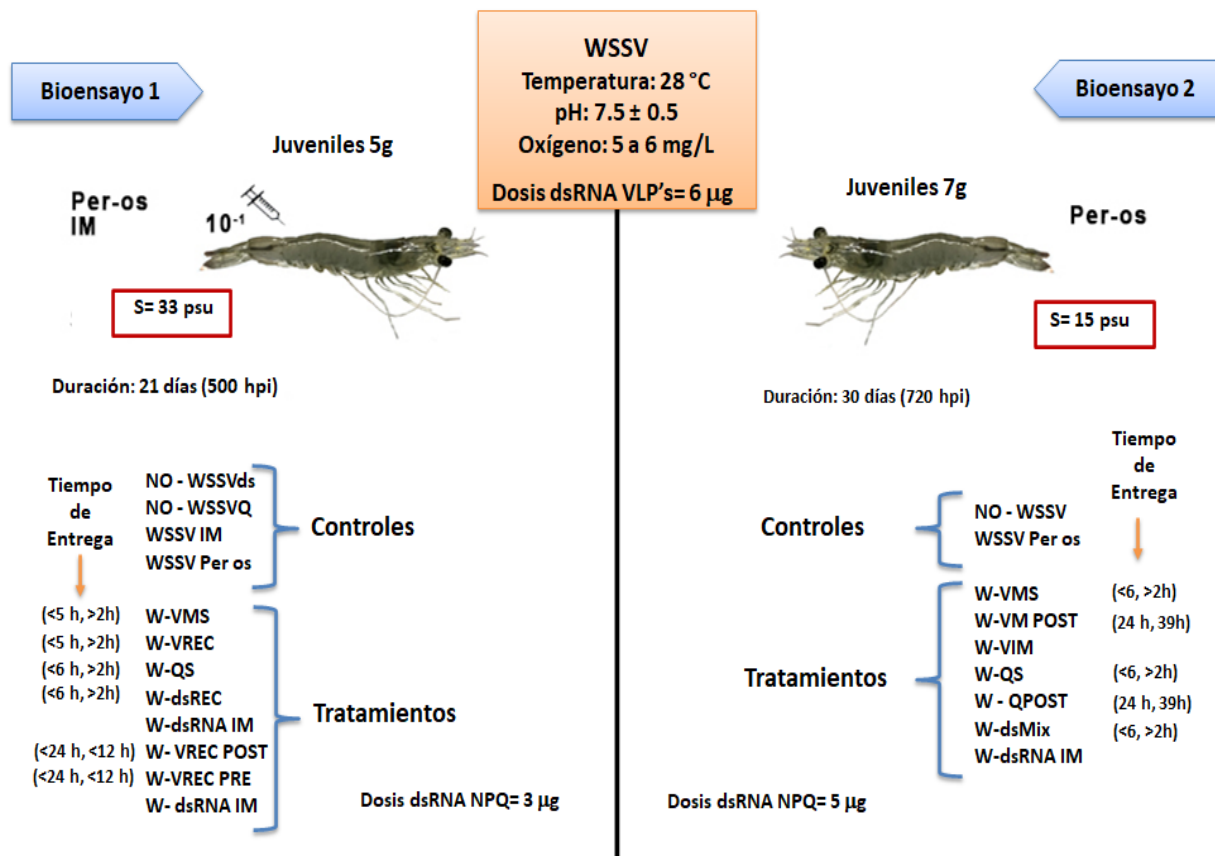


Figura 3. Descripción gráfica del diseño experimental. En el recuadro anaranjado se señalan los parámetros que compartieron ambos bioensayos, en rojo la salinidad fue el único parámetro fisicoquímico variable entre los bioensayos. Con una duración de 21 días para el primer bioensayo y para el segundo bioensayo 30 días de experimentación. La leyenda tiempo de entrega hace referencia a las horas en que se suministró el tratamiento a los organismos infectados con WSSV, donde las dosis suministradas antes a la infección tienen como símbolo < y las dosis otorgadas después de la infección con el símbolo > (Ver abreviaciones de los tratamientos y controles en la tabla 2 de este documento).

2.3.5 Desarrollo experimental Bioensayo 2

A partir de los resultados preliminares de sobrevivencia del primer bioensayo, se eligieron aquellos tratamientos que tuvieron una mejor respuesta, probando su eficacia en el segundo bioensayo suministrados Pre, simultaneo y post infección. Con la finalidad de simular la ruta de infección más recurrente en los sistemas de cultivo, se desafiaron vía Per os (sección 2.3.2) ocho grupos de organismos (n=16 dividido en 4 acuarios), un grupo se consideró como control positivo (C+) alimentado con pellet libre de dsRNA y siete grupos más de organismos tratados con dsRNA VP28 vía oral (ver tabla 2), utilizando una dosis de 6.0 µg/camarón en dos raciones de 3 µg para

el caso de las VLPs, mientras que en organismos que recibieron como terapia nanopartículas de quitosano conteniendo dsRNA_{v28}, la dosis suministrada fue de 5 µg/camarón/día en dos raciones de 2.5 µg/camarón/ración. Independiente a estos grupos en la zona libre de WSSV se mantuvo un control negativo (C-) individuos libres de WSSV. Los parámetros fisicoquímicos se mantuvieron constantes: oxígeno >5 mg/L, pH 7.8 ± 0.3 y temperatura 28.0 ± 0.5 °C. En este bioensayo se utilizó una salinidad constante de 15 ppm, por lo cual fue necesario disminuir la salinidad 2 ppm diariamente durante con agua de la llave y a partir del agua de mar.

2.3.6 Muestreos y almacenamiento

Los organismos muertos y moribundos fueron colectados diariamente conforme se fueron presentando, se etiquetaron, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C. Cabe mencionar que se registró la hora y fecha de colecta, así como el estado (moribundo/muerto/vivo) de cada individuo, para elaborar las curvas de sobrevivencia.

Tabla 2. Abreviaturas utilizadas para los distintos tratamientos

Tratamientos Bioensayo 1	Nomenclatura	Tratamientos Bioensayo 2	Nomenclatura
Control Negativo libre de WSSV inyectado con dsRNA Intramuscular (-)	NO-WSSV-ds	Control Negativo libre de WSSV	NO- WSSV
Control Negativo Quitosano Organismos libres de WSSV	NO-WSSV-Q		
VLPs mezclada en el alimento y suministrado simultáneo a la infección con WSSV	W-VMS	VLP mezclada en el alimento y suministrado simultáneo a la infección.	W-VMS
dsRNA inyectado Intramuscular	W-dsRNA IM	dsRNA inyectado Intramuscular	W-dsRNA IM
VLP inyectada Intramuscular	W-VIM	VLP inyectada Intramuscular	W-VIM
VLP incorporada en la cubierta del alimento y entregado Post infección.	W-VREC POST	VLP mezclada en el alimento y suministrado Posterior a la infección.	W -VM POST
Nanopartículas de Quitosano entregadas simultaneas a la infección	W-QS	Nanopartículas de Quitosano entregadas simultaneas a la infección	W-QS
VLP Recubierto entregado antes de la infección.	W-VREC- PRE		
Control Positivo para WSSV vía per-os	WSSV PER OS	Control Positivo para WSSV vía per-os	WSSV PER OS
dsRNA desnudo en el alimento adherido en la cubierta.	W-ds-REC	dsRNA desnudo mezclado en el alimento.	W-ds-MIX
VLP incorporada en la cubierta del alimento entregado de forma simultánea a la infección.	W-VREC	Nanopartículas de quitosano mezcladas en el alimento entregadas post infección.	W- QPOST
Control Positivo WSSV inyección Intramuscular	WSSV IM		

V= VLPs-dsRNAVP28*, Q= Quitosano

2.3.7 Análisis estadístico de las curvas de sobrevivencia

La protección contra WSSV después del suministro vía oral de los tratamientos se evaluó mediante las diferencias en los niveles de mortalidad entre los tratamientos fueron analizadas utilizando la prueba de Kaplan-Meier. Los valores probabilísticos $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Todos los análisis y gráficos de este trabajo fueron elaborados en el paquete estadístico GraphPad PRISM (V. 8.4.0).

2.4 Análisis molecular

2.4.1 Extracción de ADN

Se seleccionaron 7 organismos muestreados de cada tratamiento durante los bioensayos 1 y 2, a los cuales les fue extraído tejido muscular para obtener ADN total por el método clásico de fenol-cloroformo (protocolo modificado de Sambrook and Russell 2006). Específicamente el procesamiento de las muestras consistió en tomar 50 mg de músculo del tercer segmento abdominal de cada camarón y colocarlo en un tubo eppendorf de 1.5 mL que contenía 500 μ L de amortiguador de lisis SNET (20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 5 mM EDTA, pH 8.0; 400 mM NaCl; 1 % SDS), 2.5 μ L de Proteínasa K (20 mg/mL) y 1.5 μ L de RNasa A (20 mg/mL) para posteriormente homogenizar con un pistilo estéril. Las muestras fueron incubadas en agitación a 57 °C durante 45 minutos y centrifugadas 5 minutos a 11,000 x *g*, transfiriendo el sobrenadante a un tubo eppendorf estéril. Después se agregaron 500 μ L de Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitaron la muestras en un vortex por 15 s a alta velocidad. Hecho lo anterior se procedió a centrifugar la solución a 11,000 x *g* y al concluir se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga limpio añadiendo 500 μ L de Isopropanol mezclando por inversión 5 veces antes de proceder a incubar durante 10 minutos a -70 °C. Nuevamente las muestras fueron centrifugadas a 13, 250 x *g* durante 15 min. Se eliminó el isopropanol por decantación y se lavó el pellet adicionando 500 μ L de etanol al 70%. Las muestras se centrifugaron por 5 minutos a 13,250 *g* eliminando mediante decantación el etanol cuidando no desprender el pellet del fondo; éstos últimos se dejaron secar durante 20 min a temperatura ambiente en una campana de extracción y

re-suspendieron en 50 μ L de PPI (agua grado molecular libre de fosfatos). Finalmente, las muestras se almacenaron a -20 $^{\circ}$ C hasta su uso.

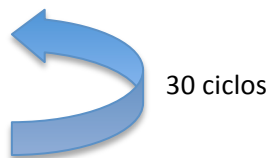
La concentración de ADN total fue determinada por espectrofotometría en un NanoDrop Lite a 260 nm. Por otra parte, se evaluó la calidad del DNA mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, usando Buffer TAE 1X (0.04 M Tris–acetato, 1 mM EDTA) por 45 min, 90 V. Los geles fueron visualizados mediante irradiación con luz ultravioleta en un transiluminador Kodak para su posterior revelado en imagen digital.

2.4.2 Reacción en cadena polimerasa PCR de Punto Final

Para verificar que hubiese productos a amplificar en el qPCR, se realizó un análisis PCR punto final para Actina en las muestras de DNA y del gen VP28 en los casos que aplicara. En el caso del gen VP28 (WSSV) se utilizó el kit de amplificación GoTaq[®] Flexi DNA Polimerasa, en reacciones que contenían los siguientes elementos: 10 ng de ADN, 3 mM de MgCl₂, 0.4 μ M dNTPs, 0.4 μ M de cada primer del gen VP28, generando un producto de 533 pb. (Valencia-Yañez, 2010), 0.5 Unidades de GoTaq[®] DNA Polimerasa, 1X Buffer Green GoTaq[®] Flexi, en un volumen final de 25 μ L. El programa de amplificación utilizado fue el siguiente: 5 min a 95 $^{\circ}$ C, 35 ciclos a 94 $^{\circ}$ C por 30 segundos, 66.5 $^{\circ}$ C por 30 seg, 1 minuto a 72 $^{\circ}$ C, 7 min a 72 $^{\circ}$ C y finalmente 10 min a 12 $^{\circ}$ C para templar los productos de la reacción (Ramos-Carreño et al., 2021).

Programa de amplificación Actina:

1. 94 $^{\circ}$ C por 5 min
2. 94 $^{\circ}$ C por 30 seg,
3. 55 $^{\circ}$ C por 30 seg,
4. 72 $^{\circ}$ C por 1 min
5. 72 $^{\circ}$ C por 5 min



Reacción para Actina:

- ✓ MgCl₂ - 2 μ M
- ✓ 0.4 μ M dNTPs
- ✓ 0.4 μ M de cada primer del gen VP28
- ✓ 0.5 Unidades DNA Polimerasa
- ✓ 1X Buffer Green GoTaq[®] Flexi
- ✓ 10 ng de ADN

2.4.3 Determinación de carga viral mediante PCR Tiempo Real (qPCR)

Para determinar la carga viral, seleccionamos siete organismos por tratamiento de ambos bioensayos (3 camarones en estado moribundo y 4 vivos). El procedimiento del análisis qPCR se elaboró con el kit TaqMan® Fast Advanced Máster Mix (Applied Biosystems, USA). Cada reacción de amplificación fue preparada con una mezcla de Máster Mix 1X, 0.3 µM de cada primer para el gen VP664, 0.15 µM de sonda TaqMan y 17.5 ng de ADN, en un volumen final de 20 µL (Durand y Lightner, 2002).

La amplificación se efectuó utilizando el sistema de detección de secuencia ABI StepOnePlus v2.0 (Applied Biosystems), con el perfil térmico descrito por Durand y Lightner, 2002. El cual consiste en la activación de la uracil-N-glycosylase (UNG) a 50 °C por 2 minutos, seguido de 10 min a 95 °C para activar la AmpliTaq Fast DNA Polimerasa, amplificando por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, la colecta de datos ópticos, 1 minuto a 60 °C, finalmente 15 min a 12° C para templar los productos de la reacción.

2.4.3.1 Curva estándar para cuantificación absoluta

Para cuantificar la carga viral se utilizó una curva estándar elaborada a partir de la dilución de un plásmido donde fue clonado un fragmento del gen VP664 (Ramos-Carreño et al., 2021). El rango de concentración de la curva fue de 3.9×10^9 a 3.9×10^4 copias.ng⁻¹. El número de copias del gen VP664 de las diversas muestras se determinó utilizando como referencia los valores de CT a partir de la curva estándar. La línea de umbral o threshold se definió de forma manual. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado, obteniendo el promedio ± SD, expresando el resultado en número de copias.ng⁻¹ para lo cual se divide el número de copias entre los 17.5 ng de DNA usados en la reacción.

2.5 Histología

Al concluir el bioensayo 2 se colectaron dos camarones por tratamiento para su procesamiento histológico. El proceso consistió en fijar las muestras en solución Davidson (330 mL de alcohol etílico al 90%, 220 mL de Formalina al 100 %, 115 mL de ácido acético glacial, 335 mL de agua

destilada) por perfusión, inyectando 0.1 a 10 ml de solución dependiendo del tamaño del camarón. Los sitios de inyección fueron la región lateral del hepatopáncreas (HP), la región anterior al HP y el tercer segmento abdominal. Posteriormente los camarones fueron cortados del primer segmento abdominal que es la unión abdomen/cefalotórax para sumergir el organismo en un frasco estéril que contenía fijador Davidson. Las muestras permanecieron inmersas en el fijador por 48 horas, continuando el procedimiento con un lavado de alcohol Etílico (EtOH) al 50% durante 24 horas, finalmente se eliminó el alcohol por decantación y se procedió a colocar nuevo EtOH al 50% para preservación de las muestras hasta su uso.

Para el embebido en parafina de las muestras fue necesario realizar un corte longitudinal del cefalotórax, quedando expuestos el HP y el estómago. Con la finalidad de extraer las branquias se retiraron los apéndices los cuales podrían interferir en la inclusión en parafina, además se cortó longitudinalmente el sexto segmento abdominal para dejar expuesto el tejido muscular e intestinal. Los diferentes tejidos fueron colocados en casetes, los cuales se procesaron en un procesador automático (LEICA TP 1020).

Los tejidos se procesaron rutinariamente con las siguientes soluciones (en el orden que se presentan): concentraciones ascendentes de alcohol (70, 80, 95 y 100%), agente clarificante Xilenol y finalmente embebidos en parafina líquida a 60 °C. La duración de la inmersión en cada solución fue de una hora con dos baños separados. Una vez finalizado el proceso de deshidratación, se colectaron los casettes y se colocaron en parafina líquida para proceder a retirar la tapa, colocando los casettes sobre un molde de embebido, llenando el molde y colocándolo sobre una placa de enfriamiento (LEICA, HistoCore Arcadia C).

Los bloques fueron cortados en un micrótopo (LEICA RM 2245) con un grosor de 5 μ m y montados sobre un portaobjetos, posteriormente todos los cortes fueron secados en una estufa a 40 °C durante 24 horas. Realizado lo anterior se efectuó la tinción de las muestras por el método general de Hematoxilina – eosina y se montaron con poli-L-Lisina como se muestra en la (figura 4). Finalmente, las laminillas se analizaron mediante microscopía óptica en un microscopio (Zeiss, Axio Scope. A1).

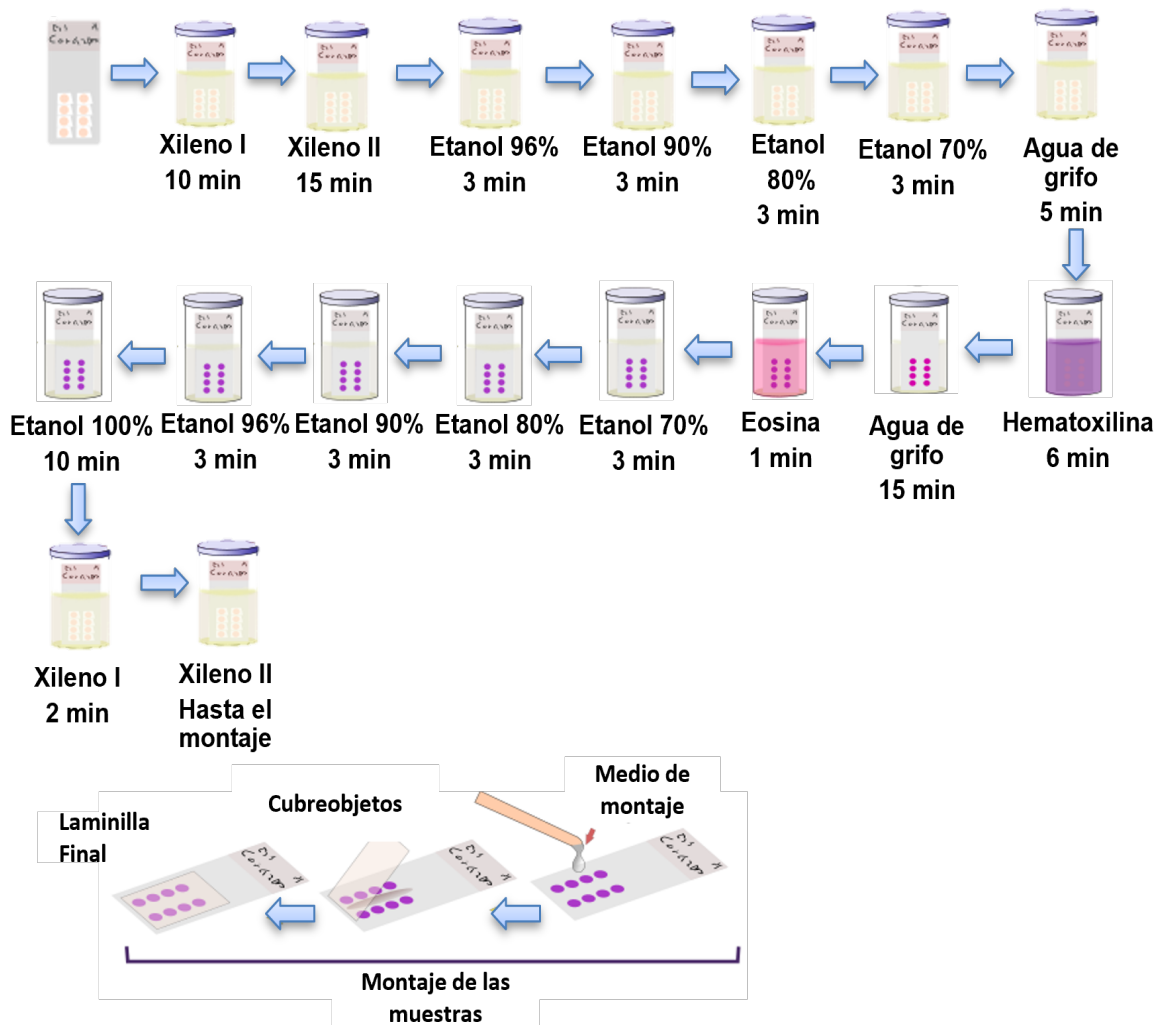


Figura 4. Descripción gráfica del procedimiento para tinción por el método Hematoxilina-Eosina (Tomado y modificado de Megías, 2020).

III. Resultados

3.1 Síntesis y caracterización de nanopartículas VLPs-dsRNAv28

En el ensayo de desplazamiento de movilidad por electroforesis (EMSA) para análisis del ensamblaje de las VLPs-dsRNAv28 se observó que la movilidad del dsRNAv28 (carril 1), del virus nativo (Carril 2) y de las VLPs-dsRNAv28 antes de realizar la diálisis fue mayor en comparación con las VLPs ensambladas (carriles 4 y 5) las cuales permanecieron en el pozo, con un recorrido a través del gel prácticamente nulo, sugiriendo que el autoensamblaje se realizó de manera exitosa (figura 5).

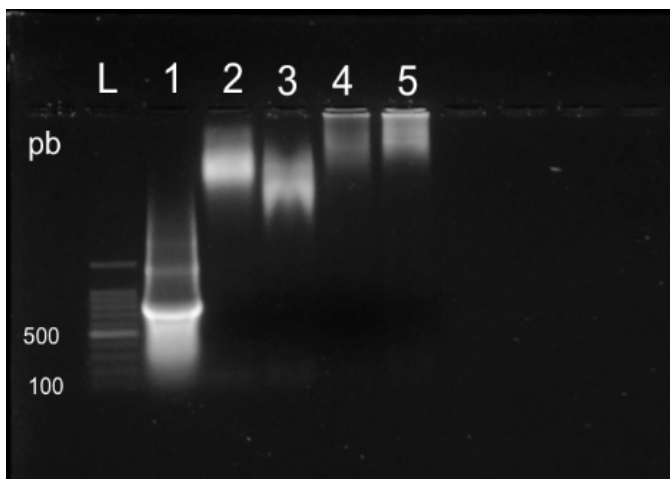


Figura 5. Análisis de ensamblaje de VLP-dsRNAv28 mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. 1, dsRNAv28 (533 pb); 2, BMV nativo; 3, cápside de BMV antes del ensamble con dsRNAv28; 4 y 5, autoensamblaje de dsRNAv28 con VLP de BMV. L, marcador de peso molecular de 100 pb; VLP, Virus Like Particle; BMV, virus del mosaico del bromo.

En la figura 5 se presentan las determinaciones del tamaño del virus del mosaico del bromo (BMV) (Figura 6A), así como también, de las VLPs-dsRNAv28, obtenidas mediante el análisis de dispersión de luz dinámica (DLS). En la figura 5A se presenta el análisis del tamaño de las partículas del virus nativo de BMV por volumen, observando un pico a 32.11 nm donde la mayor parte de las partículas se agrupan (93%). Los resultados de la medición por volumen de las VLPs-dsRNAv28 ensambladas (Figura 6B) arrojan una distribución bimodal, sin embargo, en el primer pico se agrupa el 96% de las VLPs-dsRNAv28 con un tamaño de partícula de 426 nm. El 85.2% de las NPQ se agruparon en un tamaño de partícula de 314.4 nm (Figura 5C).

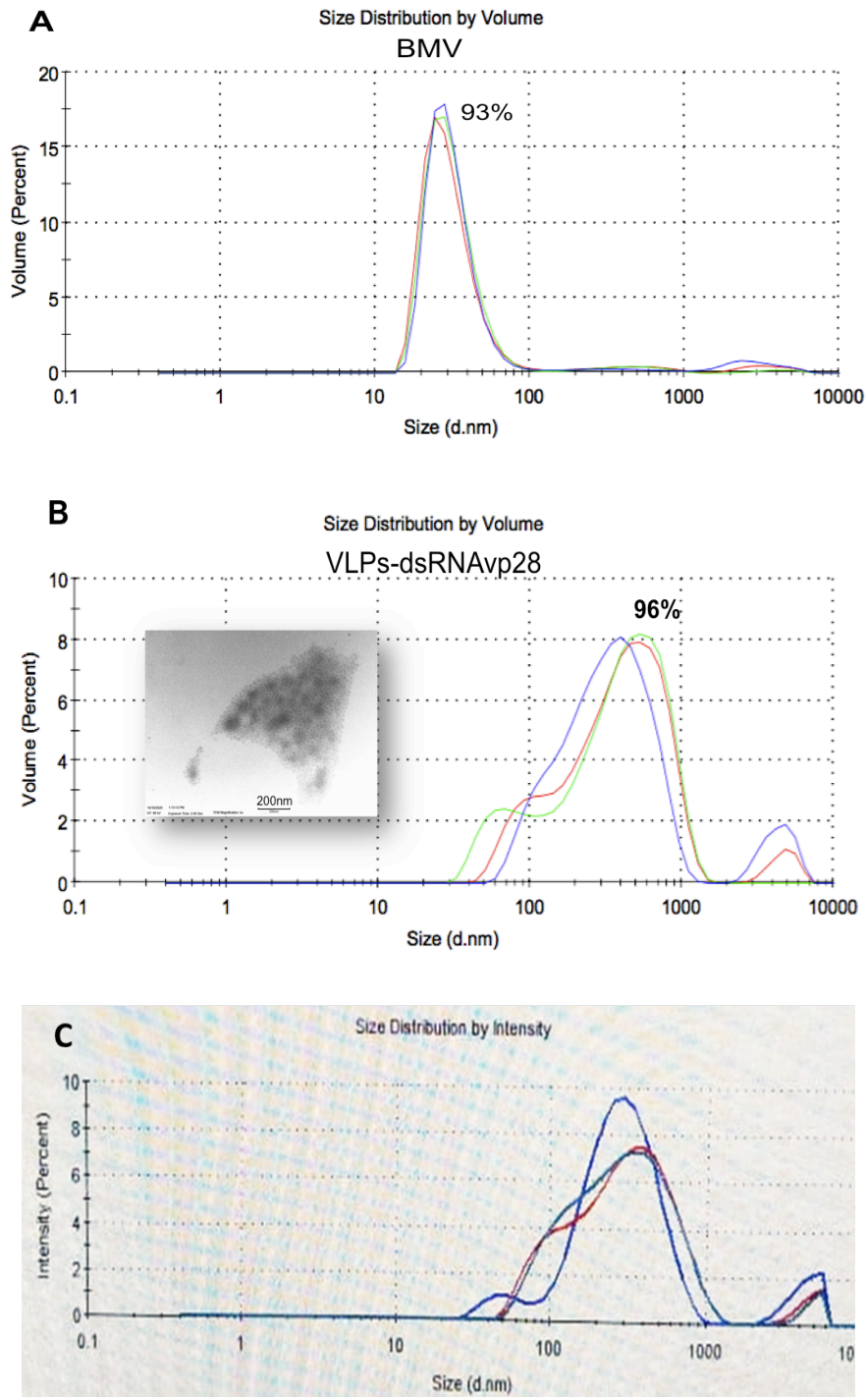
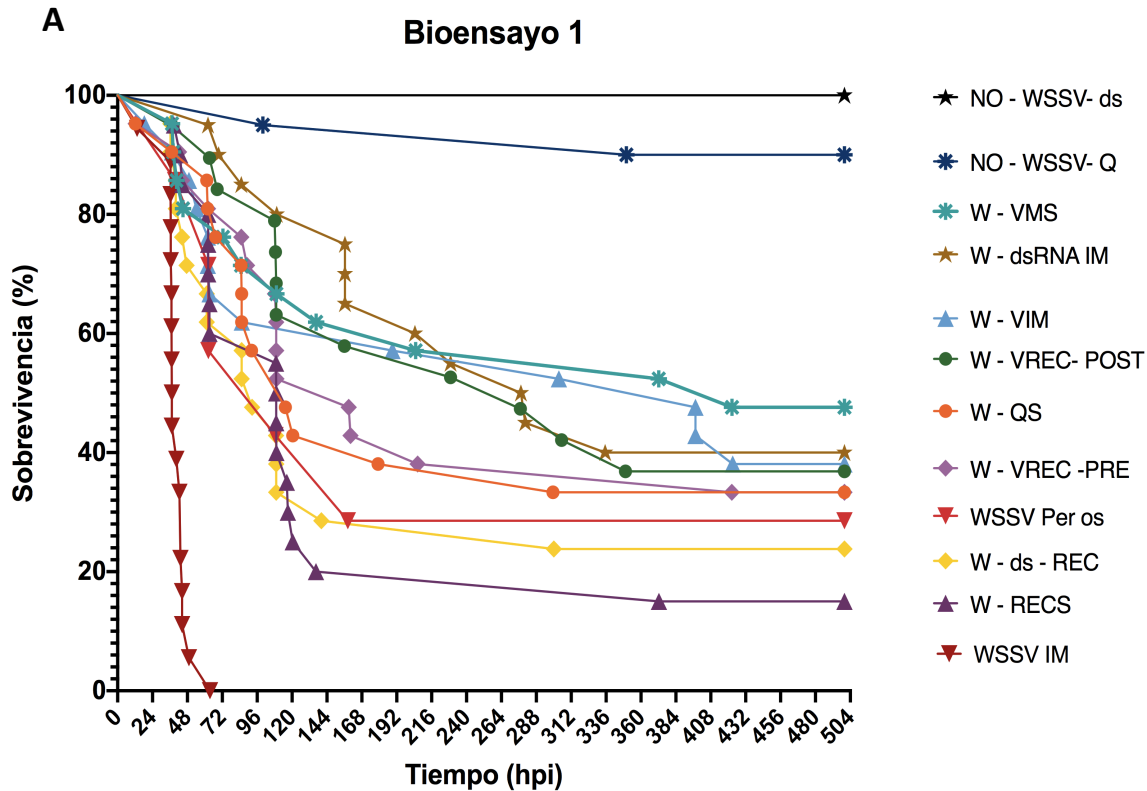


Figura 6. Análisis de dispersión de luz dinámica (DLS) por volumen para determinar el tamaño de los nanocontenedores; A) Medición por volumen del BMV nativo, **B)** medición por volumen de las VLPs-dsRNAvp28, **B')** imagen TEM 80 kv (barra 200 nm), **C)** Medición por intensidad de las NPQ; VLP, Virus Like Particle; BMV, virus del mosaico del bromo; NPQ, nanopartículas de quitosano.

3.2 Supervivencia de camarones desafiados con WSSV y tratados con dsRNAv28 incorporado en el alimento.

Los camarones infectados con el WSSV mediante inyección IM (tratamiento control positivo) murieron en su totalidad a las 63.5 hpi, mientras que, los desafiados vía Per os a las 158 hpi presentaron una tasa de supervivencia del 28%, la cual se mantuvo hasta el final de este bioensayo (Figura 7A). La mejor tasa de supervivencia (48%) respecto al control positivo (WSSV-IM) se observó en el grupo de organismos que recibió como tratamiento VLPs conteniendo dsRNAv28 mezcladas en el alimento administradas simultáneamente con el WSSV (W-VMS). Por otra parte, los organismos tratados con nanopartículas de quitosano suministradas de manera simultánea al desafío con WSSV (W-QS) mantuvieron un 33% de supervivencia en contraste con WSSV-IM, pero únicamente el 5% de supervivencia comparado con los organismos no tratados e infectados vía Per os (WSSV Per os).



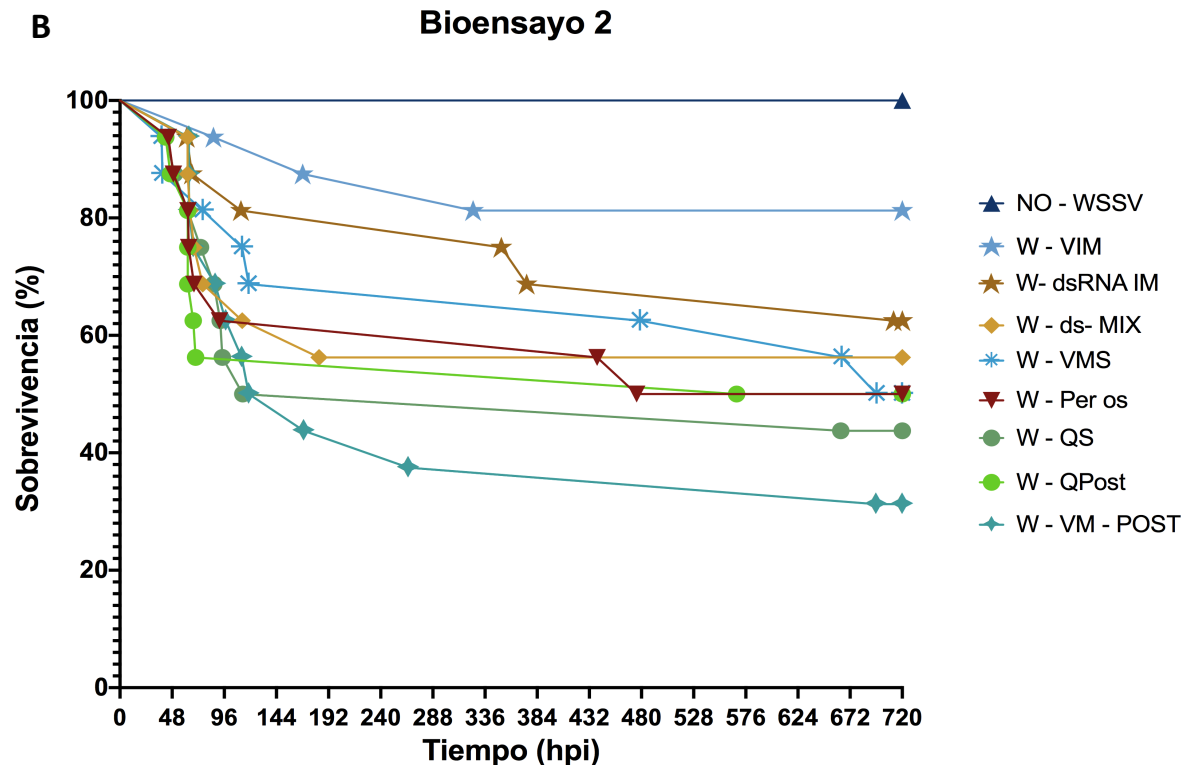


Figura 7. Efectividad de los tratamientos anti WSSV. A) Bioensayo 1 con una duración de 21 días ($p = 0.001$ y $n=21$). **B)** bioensayo 2 finalizó transcurridos 30 días post-infección ($p = 0.008$ y $n=16$). La tasa de supervivencia y los valores de p se determinaron al finalizar los bioensayos. NO-WSSV, control libre de WSSV; W-VIM, VLP Intramuscular; W-dsRNA IM, dsRNA intramuscular; W-ds-Mix, dsRNA mezclado en el alimento; W-VMS, VLPs mezclados en el alimento; W-Per os, control positivo vía per os; W-QS, nanopartículas de quitosano mezcladas en el alimento, W-Qpost, nanopartículas de quitosano en alimento suministradas post infección; W-VM-POST, VLPs en el alimento suministradas post infección; WSSV IM, desafío con WSSV vía intramuscular.

En el segundo bioensayo (Figura 7B), únicamente se incluyó un control positivo desafiado vía per os (WSSV- Per os), dicho grupo presentó una tasa de supervivencia del 50% al concluir el experimento, en este caso los grupos desafiados y tratados vía intramuscular con dsRNA (W-dsRNA IM) y VLPs (W-VIM) tuvieron la mayor tasa de supervivencia con un 81 y 62 % respectivamente. El tratamiento W-VMS presentó una supervivencia del 65 %, representando una ganancia del 15% respecto a los organismos WSSV- Per os hasta las 480 hpi ó 20 dpi, posteriormente a las 720 hpi ó 30 dpi la supervivencia este tratamiento (W-VMS) bajo al, 50% , igualando la supervivencia de los organismos positivos a WSSV. El tratamiento quitosano suministrado post infección (W-QPOST) refleja una eficacia del 0% respecto al control positivo (WSSV- Per os) utilizado en este experimento. Finalmente se observó que en ambos bioensayos la mayor tasa de mortalidad se presentó entre las 48 y 150 hpi (2 y 6 dpi) en los diferentes tratamientos.

3.3 Evaluación de calidad de las extracciones de ADN y eficiencia de amplificación de las muestras para su posterior cuantificación.

El ADN total extraído del músculo del camarón fue de buena calidad, esto se vio reflejado en los productos de amplificación por PCR punto final (Figura 8); Actina, exclusiva del camarón y vp28 presente en los viriones de WSSV. El gen actina (Figura 8A) amplificó en todas las muestras, observando una sola banda a 626 pb. Para el gen vp28 (Figura 8B) se observó una sola banda a 533 pb en todas las muestras examinadas, corroborando la amplificación de dicho gen.

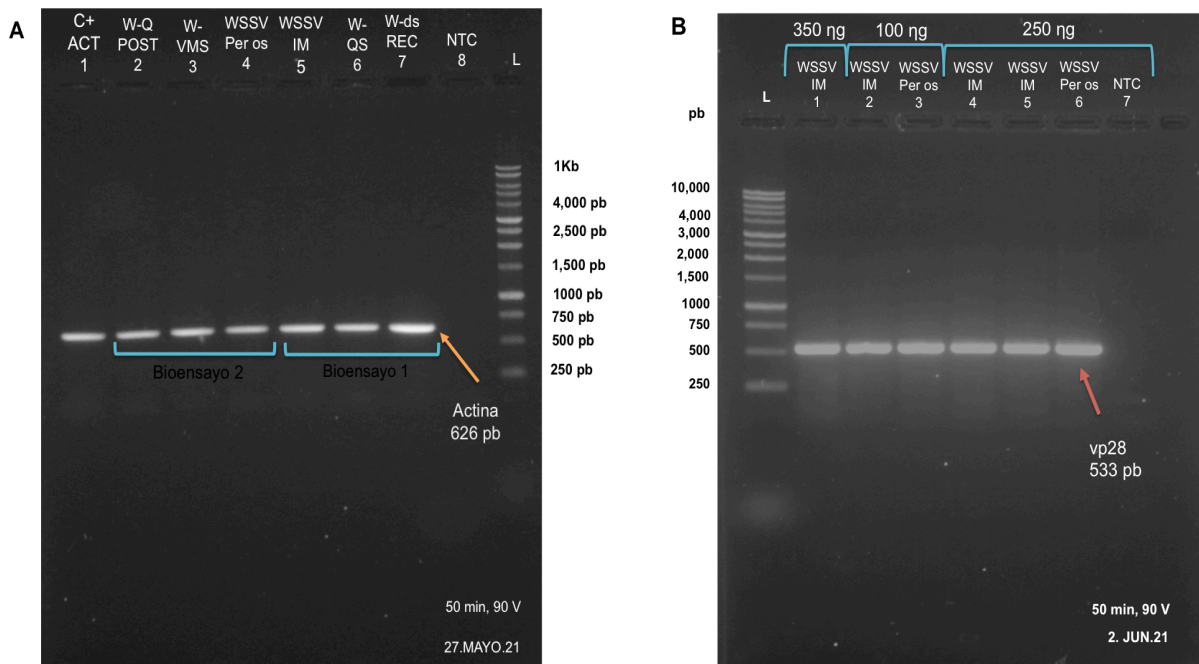


Figura 8. Productos de amplificación por PCR de punto final para Actina y vp28. **A)** Actina (626 pb), donde el carril 1 corresponde a un control positivo para actina; carriles 2 a 4 muestras del bioensayo 1 y los carriles 5 a 7, muestras del segundo bioensayo, 8 corresponde a un control negativo sin muestra. **B)** PCR de vp28 (533 pb), donde los carriles 1 a 6 corresponden a camarones infectados con WSSV y el carril 7 a un control negativo sin muestra. L es el marcador de peso molecular (1kb). Electroforesis en gel de agarosa al 1%. C+ACT, Control positivo para actina; W-QPOST, nanopartículas de quitosano suministrado posterior al desafío con WSSV; W-VMS, VLPs mezcladas en alimento; W-Per os, control positivo vía per os; WSSV IM, desafío con WSSV vía intramuscular; W-QS, nanopartículas de quitosano suministradas simultáneamente al desafío; W-dsREC, dsRNA aplicado en la cubierta del alimento y suministrado de manera simultánea a la infección con WSSV.

3.4 Evaluación de carga viral y efectividad de los distintos tratamientos contra el WSSV

La curva estándar para cuantificar la carga viral del gen vp664 del WSSV presentó los siguientes valores: ajuste de la recta ó $R^2 = 0.98$, pendiente ó $m = -3.33$ y eficiencia ó $E = 99.6\%$ (figura 9).

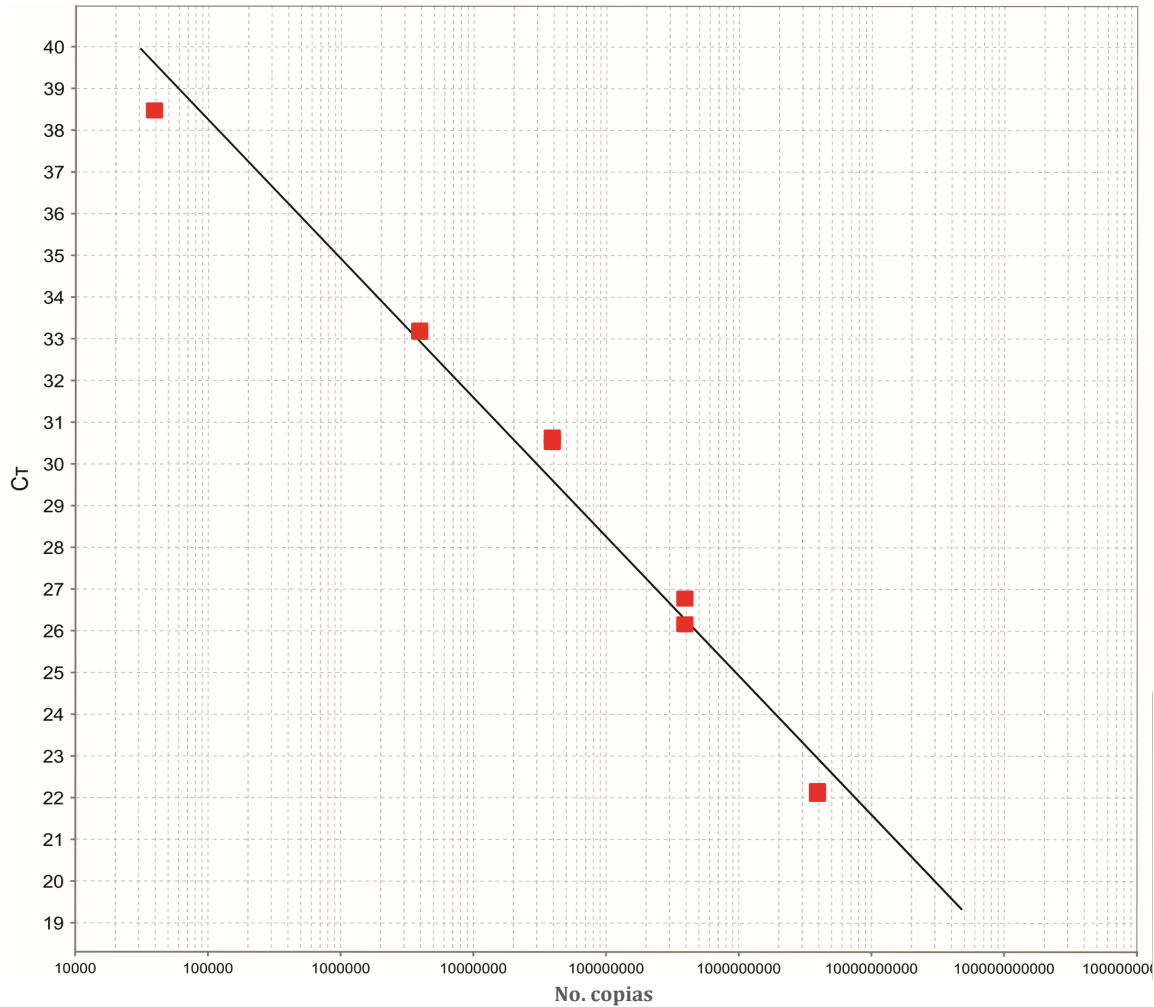


Figura 9. Curva estándar para qPCR construida a partir de la dilución serial 1:10 (3.7×10^8 a 3.7×10^4 copias. ng^{-1}) del plásmido vp664. $R^2 = 0.98$, $m = -3.33$ y $EF = 99.6\%$.

En la figura 10, se presenta la amplificación del gen vp664 en camarones moribundos del control positivo WSSV Per os con un umbral de ciclo (Ct) promedio de 19. De manera similar, los individuos infectados con WSSV y tratados con VLPs mezclados en el alimento e infectados con WSSV de forma simultánea en estado moribundo, (W-VMS) amplifican con un $Ct \cong 21$. Comparativamente, los organismos sobrevivientes, sin síntomas de la enfermedad, que fueron tratados con W-VMS presentaron $Ct > 34$.

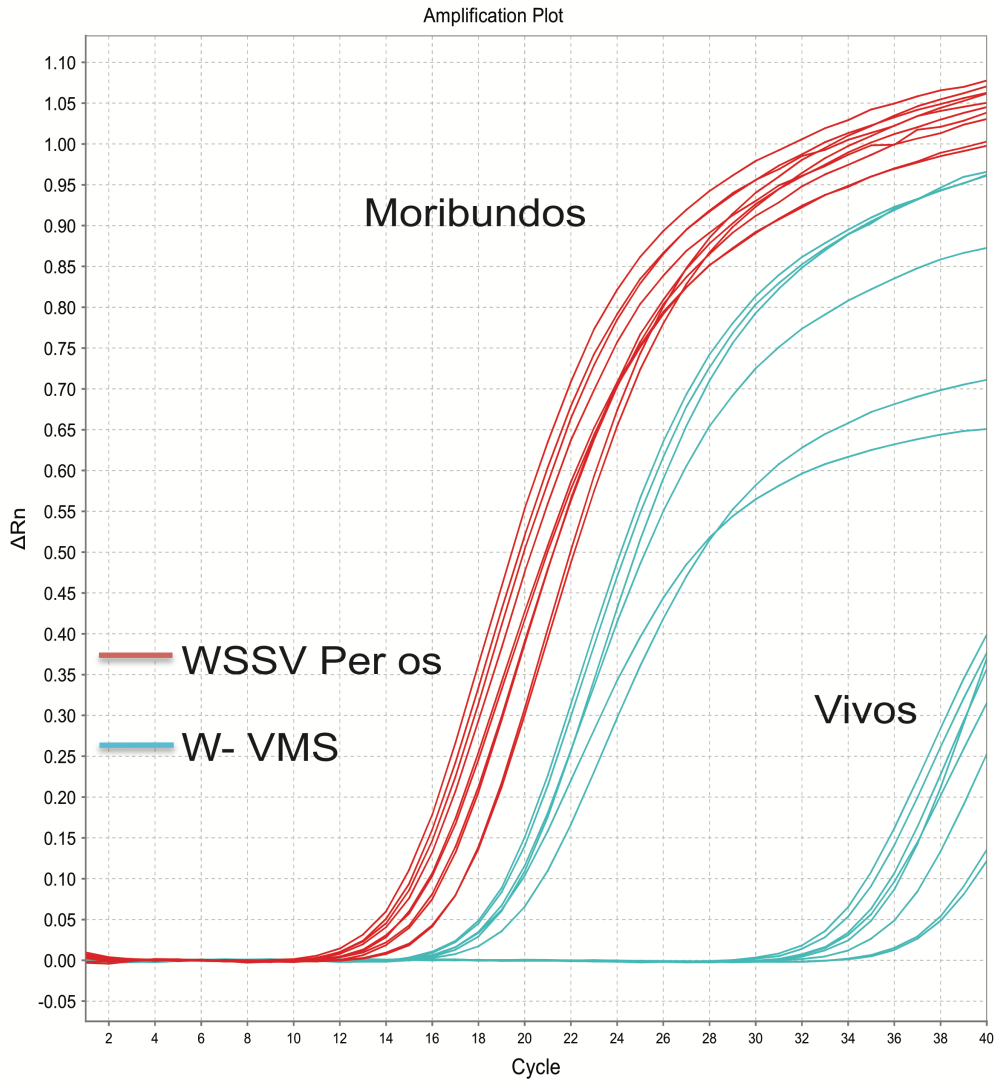
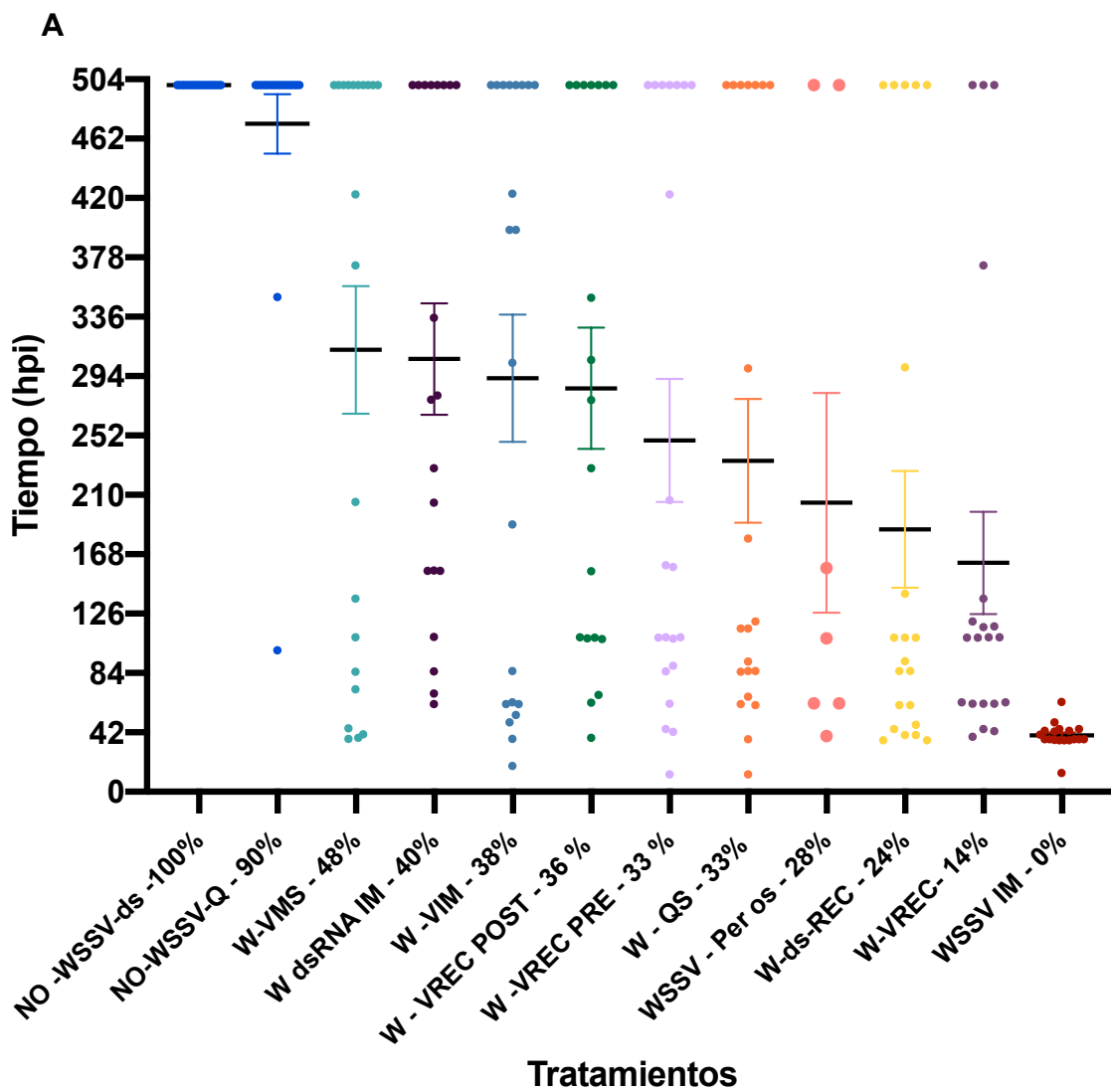


Figura 10. Curva de amplificación por qPCR de vp664. Organismos desafiados vía Per os (WSSV Per os) e individuos tratados con VLPs-RNAvp28 mezcladas en el alimento suministradas de manera simultánea al desafío (W-VMS). (n= 7). Individuos moribundos, presentaban síntomas de la enfermedad y fueron colectados antes de morir; Individuos vivos, colectados al final del experimento sin signos típicos de infección por WSSV.

Finalmente, se realizó una comparación de los tratamientos por tiempo de sobrevivencia y carga viral presentada durante los bioensayos 1 y 2 (Figuras 11 y 12 respectivamente).

Para el bioensayo 1 la mejor sobrevivencia (315 hpi ó 13 dpi) se presentó en el grupo de camarones desafiado con el virus de la mancha blanca y tratado con VLPs mezcladas en el alimento (W-VMS) (Figura 11A), seguido por el tratamiento dsRNA IM con una sobrevivencia media de 300 hpi (12 dpi), observando así una ganancia de 100 horas (4 dpi) respecto al control positivo per os (WSSV- Per os) el cual no recibió tratamiento alguno. Con relación a los organismos

no tratados pero desafiados con WSSV vía intramuscular se observó una ganancia en la supervivencia de 250 hpi ó 10 dpi (Figura 11A). Por otra parte los resultados de carga viral indican que el tratamiento W-VMS presenta una carga viral de 1×10^8 copias.ng⁻¹ en organismos *P. vannamei* moribundos y en organismos vivos no se detectó WSSV, mientras que, en los organismos moribundos desafiados vía per os no tratados (WSSV- Per os) se observó una carga viral de 1×10^{10} copias.ng⁻¹ y en los vivos este indicador presentó un valor en el rango de 1×10^8 y 1×10^5 copias.ng⁻¹ (Figura 11B).



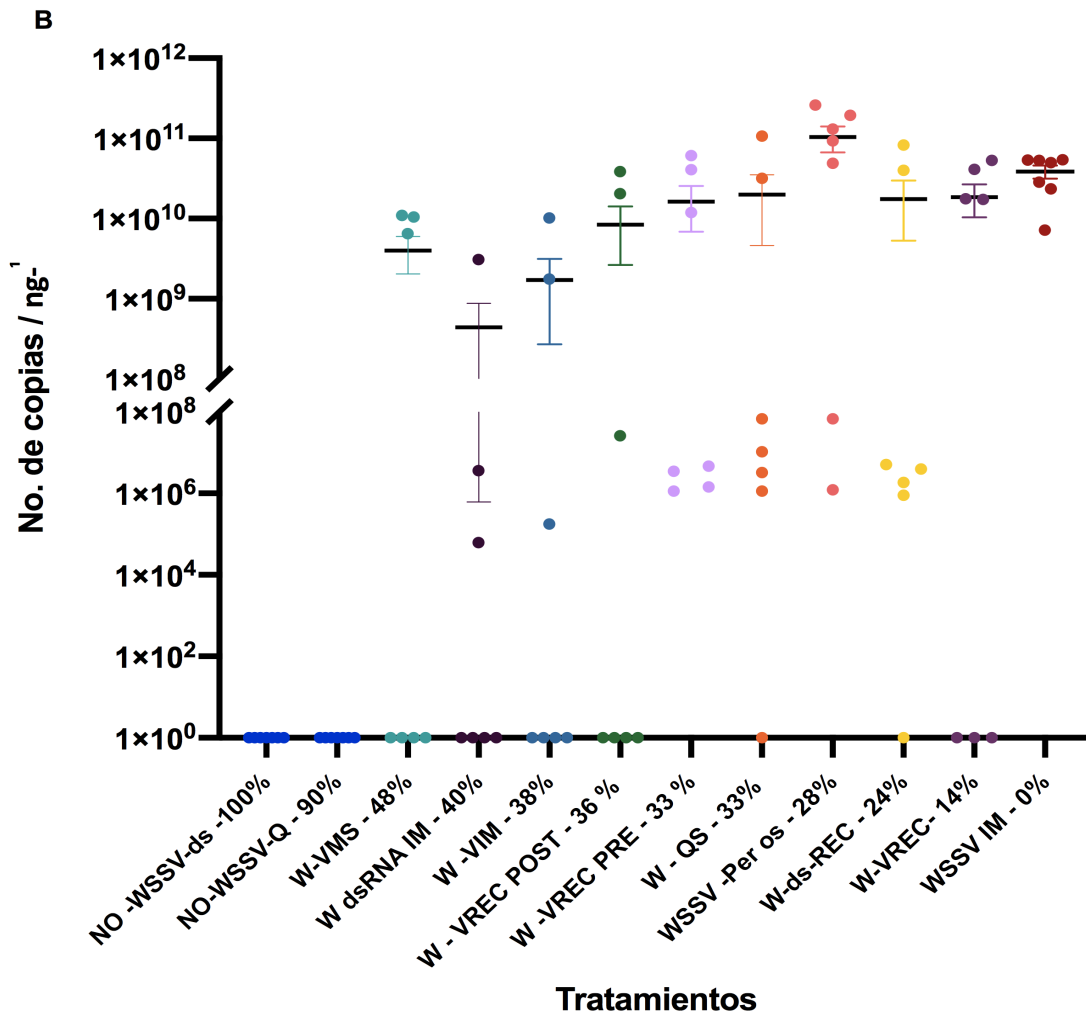
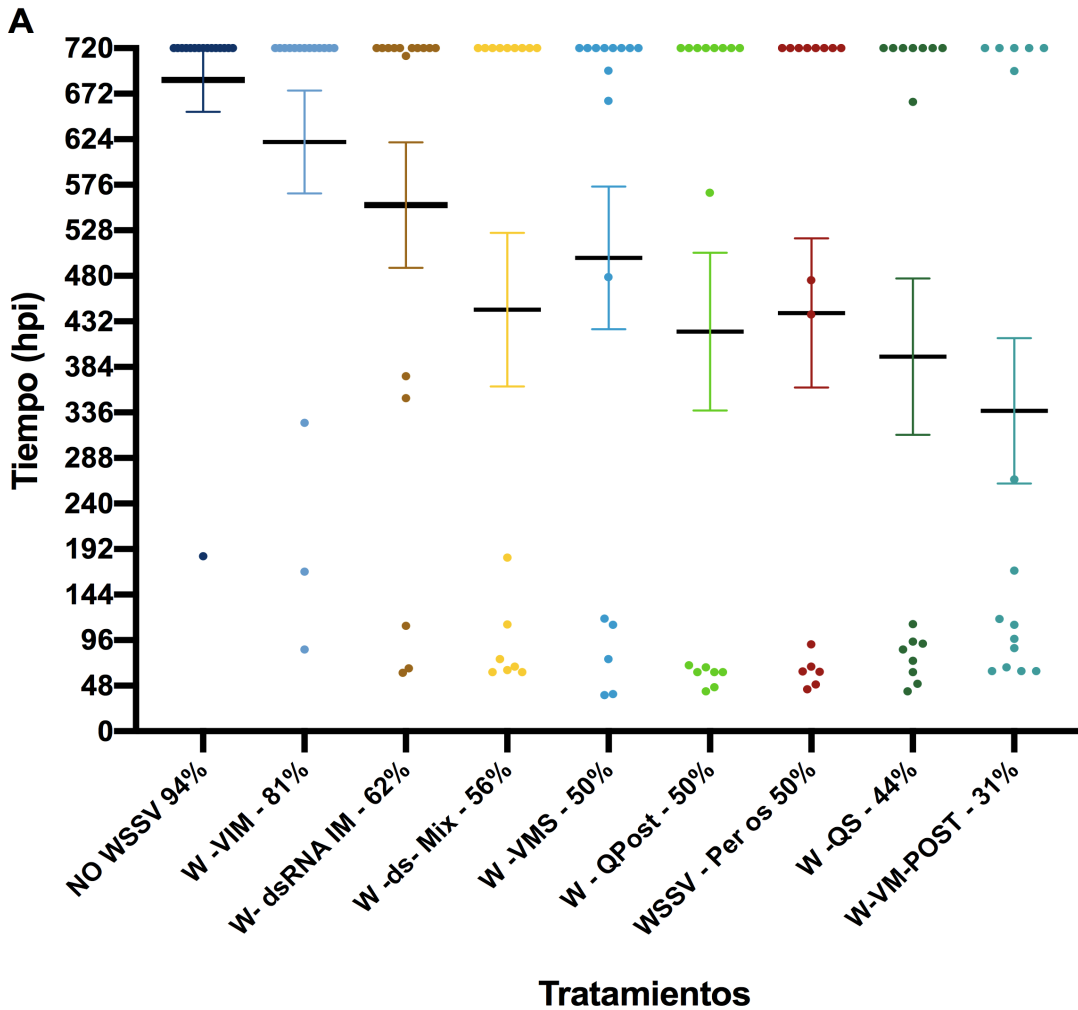


Figura 11. Comparación de la sobrevivencia media y la carga viral de organismos del primer bioensayo desafiados con WSSV y tratados con dsRNAvp28. A) Sobrevivencia media de organismos *P. vannamei* desafiados con WSSV, tratados con dsRNAvp28 contenido en VLPs y nanopartículas a base de quitosano (NPQ) incorporados en el alimento (n=16). B) Carga viral de organismos desafiados con WSSV y tratados con dsRNAvp28 (n=7; 3 moribundos y 4 vivos por tratamiento). Círculo organismos colectados vivos, sin signos aparentes de la infección causada por WSSV.

En el segundo bioensayo (Figura 12) la mejor sobrevivencia media (624 hpi ó 26 dpi) se presentó en el grupo de individuos desafiados con WSSV y tratados con VLP IM, seguido por el tratamiento dsRNA IM con una sobrevivencia media de 570 hpi (casi 24 dpi), presentando, una ganancia de 176 y 122 horas (7 y 5 días respectivamente) en la sobrevivencia respecto al control positivo per

os (individuos que no recibieron ningún antiviral). Por otro lado, los individuos infectados con WSSV pero tratados con VLP IM y dsRNA presentaron una carga viral diferente entre vivos (1×10^5 copias.ng⁻¹ a 1×10^0 copias.ng⁻¹) y moribundos (1×10^8 copias.ng⁻¹ a 1×10^6 copias.ng⁻¹), mientras que en los moribundos desafiados vía per os que no recibieron ningún antiviral (WSSV- Per os), presentaron mayor carga viral de 1×10^9 copias.ng⁻¹, y por el contrario los individuos vivos de este mismo tratamiento fueron negativos para WSSV. En este mismo bioensayo, los individuos que recibieron como tratamiento W-VMS presentaron una sobrevivencia media de 552 hpi (23 dpi), indicando una ganancia de 104 hpi (4 dpi) respecto al grupo de individuos que no recibieron tratamiento alguno (Figura 12B).



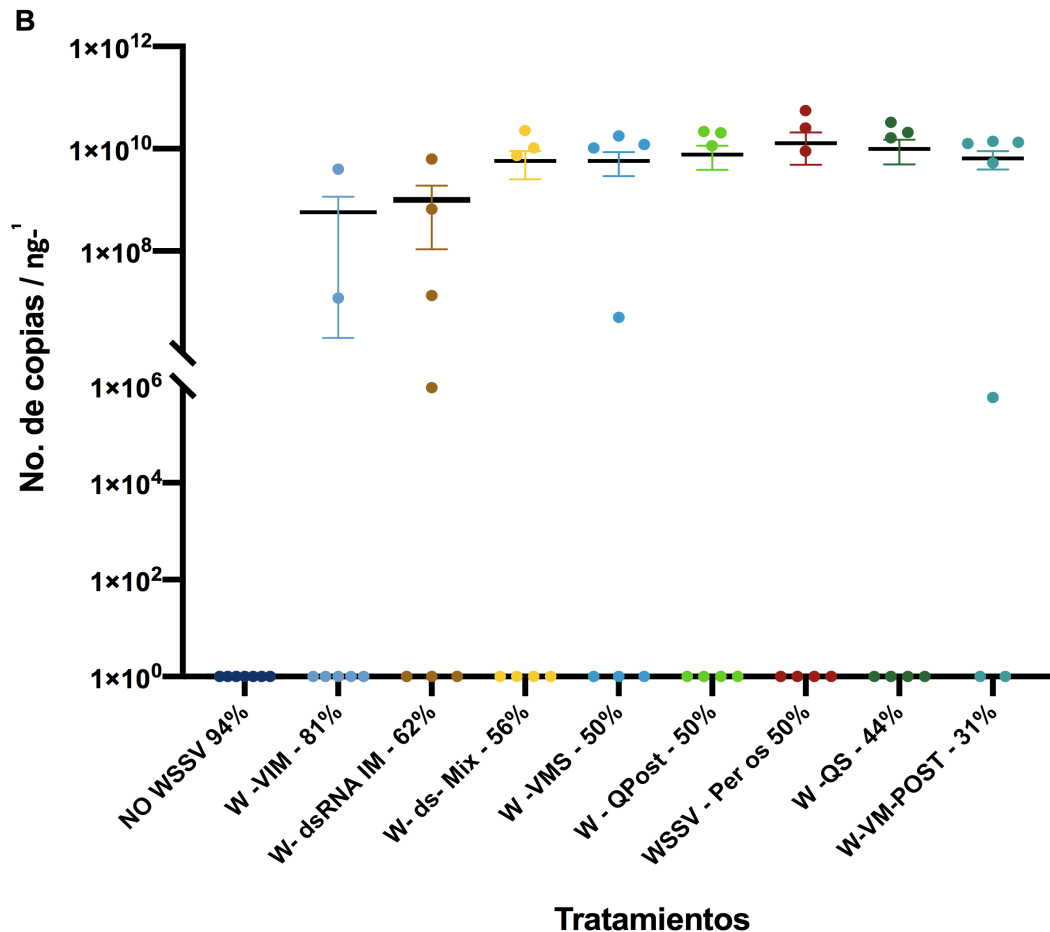


Figura 12. Comparación de la sobrevivencia media y la carga viral de organismos del segundo bioensayo desafiados con WSSV y tratados con dsRNAvp28. A) se presenta la sobrevivencia media de organismos *P. vannamei* desafiados con WSSV y tratados con dsRNAvp28 contenido en VLPs y nanopartículas a base de quitosano (NPQ) incorporados en el alimento (n=16). B) muestra la carga viral de organismos desafiados con WSSV y tratados con dsRNAvp28 (n=7). Círculo organismos colectados vivos, sin signos aparentes de la infección causada por WSSV.

3.5 Evaluación de la presencia de cuerpos de inclusión viral en organismos *P. vannamei*

Los resultados para el análisis histológico sugieren que el control positivo WSSV Per os (Figuras 13 A y 13 B) presenta núcleos hipertrofiados en la zona del hepatopáncreas, así como, cuerpos de inclusión viral teñidos basofílicamente, mientras que, en los organismos desafiados con WSSV sobrevivientes al desafío y tratados con nanopartículas de quitosano (W-QS), VLPs Mix Post (W-VM-POST) y VLP mix simultáneo (W-VMS) se observan células normales, es decir, no hay evidencia que indique la presencia de cuerpos de inclusión viral de WSSV (Figura 13).

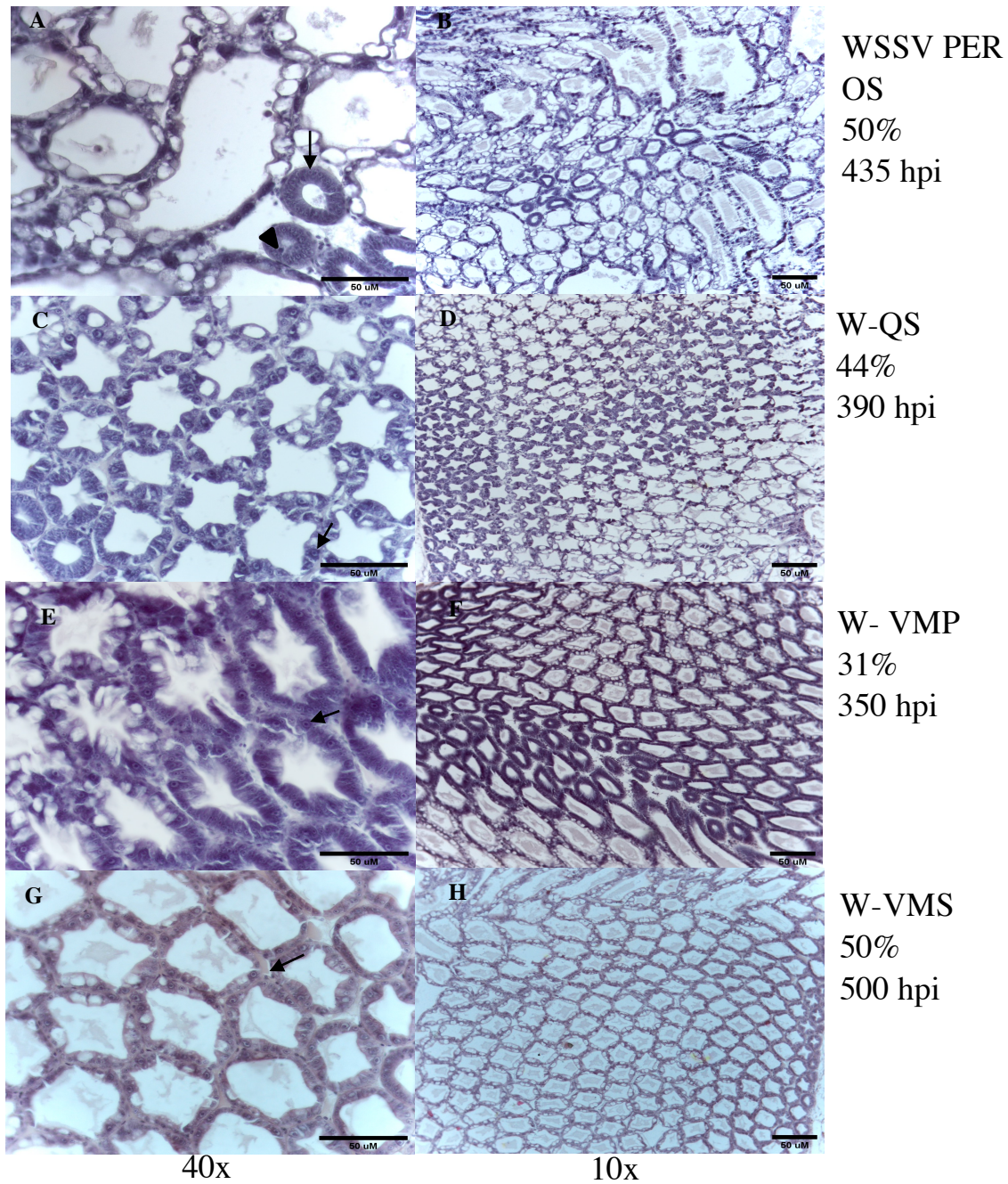


Figura 13. Histología del virus de la mancha Blanca (WSSV) en *P. vannamei* (organismos sobrevivientes al concluir el segundo bioensayo) basado en el método de tinción H&E. (A y B) Cuerpo de inclusión viral de WSSV (triángulo negro) en hepatopáncreas de organismo WSSV Per os; (C y D) células normales (flechas negras), corte transversal de hepatopáncreas de organismos W-QS; (E y F) corte transversal de hepatopáncreas de organismos del tratamiento W-VM POST IM; (G y H) corte transversal de hepatopáncreas de organismos del tratamiento W-VMS. Barras de escala = 50 µm

IV. Discusión

Robalino y colaboradores (2004) demostraron que el camarón *P. vannamei* desafiado con WSSV tiene mayor sobrevivencia cuando se aplica como terapia dsRNA VP28 mediante inyección. Diversos estudios han corroborado este resultado y el impacto de inhibir este gen vía oral e intramuscular (Robalino et al., 2005; Xu et al., 2007; Sarathi et al., 2008, 2007; Mejía-Ruiz et al., 2011; Ramos-Carreño et al., 2021). Sin embargo, consideramos que la vía de aplicación mediante inyección intramuscular tiene dos desventajas para la camaronicultura: 1) los costos de producción del dsRNA per se pueden ser elevados relativos a los costos de producción del camarón y 2) el método por inyección no es viable a nivel masivo (Chandrika y Puthiyedathu, 2021).

Como una posible solución al método intramuscular en este trabajo se probó la administración de dsRNAvp28 contenido en nano vehículos biológicos como lo son las VLPs de BMV y nanopartículas elaboradas a base de quitosano suministradas vía oral como tratamiento antiviral, evaluando su eficacia para entregar dsRNAvp28. Hasta el momento no se ha reportado ningún efecto adverso con el silenciamiento del gen vp28 en camarón blanco del pacífico.

De acuerdo con el análisis de ensamblaje de las VLPs de BMV el dsRNA se encapsuló eficientemente con la cápside de BMV, utilizando una proporción de masas de 1:7 de dsRNAvp28/CP. Lo cual es estrechamente cercano a la relación utilizada en estudios realizados para la elaboración de VLPs de BMV sintetizadas de forma exitosa encapsidando siRNA (Nuñez – Rivera et al., 2020), así como, en la producción de VLPs de BMV a partir de una proteína recombinante de la cápside de dicho virus expresada en un sistema bacteriano con una proporción de 1:6 tRNA/rCP (Strugala et al., 2021). Es importante destacar que desde nuestra perspectiva la investigación de Strugala et al, (2021) respecto a la producción en vectores de clonación en lugar de siembra y cosecha de la planta representa un gran avance para facilitar la producción de VLPs de BMV y una posible reducción de su costo a futuro.

En lo que respecta al tamaño de los VLPs (Figura 6), la presencia de partículas de un tamaño mucho mayor al del BMV nativo, indica que las partículas se encuentran agregadas, lo cual fue posible constatar mediante imagen de TEM, donde se observan diversas agrupaciones de dichas partículas. A pesar de que el tamaño de las VLPs-dsRNAvp28 fue mayor al esperado, la funcionalidad de las partículas quedo demostrada con los resultados de sobrevivencia y carga viral

encontrados en este trabajo donde se obtuvieron resultados similares a los reportados por Ramos-Carreño et al, (2021).

Desafortunadamente para este trabajo únicamente se determinó el tamaño de las nanopartículas de quitosano por DLS, pero no por MET. Diversos estudios señalan que el tamaño de las nanopartículas de quitosano elaboradas por el método de gelación iónica dependerá en gran medida de la relación quitosano/ tripolifosfato de sodio y el pH utilizados (Calvo et al., 1997; Fan et al., 2012; Carmona et al., 2018). Sin embargo, su menor tamaño con respecto a las agregaciones de BMV y su efecto en sobrevivencia indican que también fueron funcionales.

El método para elaboración de las VLPs está bien estandarizado y ha demostrado su funcionalidad como nanocontenedor de dsRNA para la activación del mecanismo de interferencia como terapia génica, tanto en camarones *P. monodon* con el uso de VLPs a base de IHHNV (Jariyapong et al., 2019) y VLPs elaborados a partir de virus vegetales; tal es el caso del Virus del moteado clorótico del caupí (VLPs de CCMV) probado en *P. vannamei* (Ramos-Carreño et al., 2021), como terapia contra WSSV. En este estudio la mejor estrategia para realizar la entrega del dsRNAVP28 de acuerdo con el porcentaje final de sobrevivencia, se observó en los individuos que recibieron como tratamiento VLPs incorporadas en el alimento (48% bioensayo 1) y vía intramuscular (42% bioensayo 1 y 81% para el bioensayo 2). Nuestros resultados son comparables con los de Ramos-Carreño et al., (2021) quien obtuvo 40% de supervivencia al suministrar dsARNVP28 encapsidado en partículas del CCMV contra el WSSV, administrado mediante vía oral incorporado en el alimento en *P. vannamei*. En otro estudio la administración oral con una dosis de 6 µg de dsRNA multi-WSSV (VP28 y WSSV051) , redujo el 60% de mortalidad acumulada (40% de sobrevivencia a los 7 dpi) y retrasó el tiempo promedio de muerte en comparación con el grupo no tratado después de la infección con WSSV (Thammasorn et al., 2015), resaltar que el trabajo de Thammasorn es uno de los pocos estudios donde la preparación del tratamiento oral es mayor a escala piloto (1 kg).

El grupo de camarones a los que se les suministró VLPs-dsRNAvp28 vía oral de forma simultánea al desafío (W-VMS), evidenció una tasa de supervivencia del 48 %, así como un retraso en la carga viral en los organismos sobrevivientes, sugiriendo que la respuesta al tratamiento dependerá del momento en que sea suministrado. Existen respuestas transcriptómicas que ocurren en las primeras etapas de interacción entre WSSV y el hospedero, lo cual soporta el hecho de que este

tratamiento tuviera una mejor respuesta en comparación con los tratamientos proporcionados posteriores al desafío (Millard et al., 2021). Mientras que los dosificados pre y post infección muestran menor incremento en la sobrevivencia respecto a los organismos *P. vannamei* no tratados.

La eficacia de los nanocontenedores de dsRNAvp28 y el dsRNAvp28 desnudo reflejan menor sobrevivencia media y mayor carga viral, y organismos vivos que presentan una baja carga viral, exhiben una sobrevivencia media alta. En contraste con el primer bioensayo donde la mejor tasa de sobrevivencia se observó en individuos tratados con VLPs suministradas de manera simultánea al desafío W-VMS (48%), observamos que el tratamiento W-VMS para el segundo bioensayo tiene una sobrevivencia del (50%) al igual que los organismos que no recibieron tratamiento alguno (WSSV Per os). Es importante señalar que, en este segundo bioensayo, si bien el tratamiento W-VMS no tuvo el mismo efecto en la tasa de supervivencia, la ganancia en sobrevivencia media respecto a las horas post infección es similar en ambos experimentos para este tratamiento (104 hpi), lo cual ofrece una ventana del tiempo al productor para cosechar o para tratar los estanques una vez que se diagnostican la presencia de casos positivos en la granja de camarón.

En organismos *P. vannamei* tratados con dsRNAvp28 encapsulado en nanocontenedores de quitosano, la carga viral evidencia que el retraso en el carga viral (1×10^0 a 1×10^8 copias.ng⁻¹) y la sobrevivencia (33% a 21 dpi) son menores en comparación con los tratamientos donde la entrega del dsRNA se realizó a través de VLPs de BMV. Sin embargo, durante la colecta de organismos moribundos tratados con nanopartículas de quitosano no se observó la signología típica de WSSV (coloración rojiza, letargia, exoesqueleto blando). Organismos *P. monodon* a los que se les suministró vía oral nanopartículas de quitosano conteniendo dsRNA VP28 presentaron un 37% de sobrevivencia (Sarathi et al., 2008). Mientras que Ufaz et al. (2018) encontraron una sobrevivencia del 99% al 80% a los 14 dpi, en camarones expuestos a WSSV y tratados con nanopartículas de quitosano-RNA vía IM, concluyendo que el diseño de los bloques de construcción moleculares juega un papel importante en la estructura y función de la nanopartícula supra-molecular autoensamblada.

De acuerdo con Chandrika et al. (2021) hasta ahora, ningún producto proteico heterólogo se ha fabricado comercialmente con éxito para combatir la infección causada por WSSV. Además,

expone que el uso de dsRNA viral específico podría prolongar la protección hasta 28 días después de recibir varias dosis de refuerzo, concordando con algunos de los hallazgos encontrados durante el desarrollo de este estudio, así como, con la investigación bibliográfica realizada. Sin embargo, consideramos que por vía oral más allá del método de entrega, podrían existir barreras naturales que no permiten una mayor absorción vía oral, debido a que al comparar los resultados de trabajos donde la vía de entrega de dsRNA es IM se encuentra un alto porcentaje de sobrevivencia, mientras que la entrega vía oral parece no superar el 50% de sobrevivencia en la mayoría de los casos, por lo cual sugerimos se realicen estudios de farmacocinética en este tipo de experimentos, para conocer mejor los procesos de absorción, distribución y alcance de la terapia vía oral, ya que, en la mayoría de los trabajos consultados al igual que en el presente, únicamente se evalúa la respuesta del hospedero al tratamiento en presencia de WSSV mediante curvas de sobrevivencia y evaluación de la carga viral.

Esta investigación corrobora el uso de los VLPs como nancontenedores funcionales para entrega de dsRNA. Pero es importante tener en cuenta que cada individuo tendrá respuestas diferentes ante la presencia del WSSV. La única variable modificada entre los bioensayos 1 y 2 fue la salinidad (34 ups y 15 ups respectivamente), con los controles positivos para WSSV (que no recibieron tratamiento) fue posible observar la diferencia en sobrevivencia relacionada con dicho parámetro, obteniendo un 28% de sobrevivencia en el bioensayo uno y en el segundo bioensayo un 50% de sobrevivencia. De acuerdo con lo reportado por Ramos-Carreño et al. (2014) los organismos *P. vannamei* expuestos a WSSV presentan menores tasas de mortalidad cuando se encuentran cerca del punto isoosmótico (15 a 28 ups). Los resultados anteriores son similares a los encontrados por Olivas-Valdez en 2008, sugiriendo que en salinidades mayores a los 30 ups (g L^{-1}) la infección por WSSV impacta los procesos de osmorregulación con posibles efectos adversos en la salud de estos organismos, mientras que, en organismos expuestos a salinidades por debajo de los 30 ups parece presentarse una baja tasa de mortalidad (Olivas, 2008). Aunque no fue el objetivo principal de este trabajo, pudimos observar que la interacción hospedero – patógeno se presenta de diferente forma dependiendo el ambiente.

V. Conclusiones

- 1- Se logró encapsidar dsRNAvp28 en VLPs de BMV y en nanopartículas de quitosano, las cuales fueron incorporadas y adheridas en alimento tipo pellet.
- 2- El tratamiento oral más eficiente fue VLP-dsRNAVP28 mezclado en el alimento y suministrado de forma simultanea (VMS), confiere un 48% de sobrevivencia con respecto a los organismos desafiados sin tratamiento.

El nanocontenedor elaborado a base de quitosano (NPQ) en las condiciones de este trabajo, resultó menos eficiente (solo 15% de sobrevivencia) que las VLPs para hacer la entrega del dsRNA vía oral.

El mejor tiempo de entrega de la terapia es antes o simultaneo al desafío con WSSV, lo cual sugiere que este tratamiento de forma profiláctica puede ser funcional en cultivos comerciales. A mayor tiempo post infección se ve reducida la eficacia del tratamiento (sugerimos la aplicación de un refuerzo transcurridos 14 días de la primera toma).

- 3- El 50 % de los camarones del tratamiento W-VMS vivieron 104 horas (4 días) más con respecto a los camarones infectados con WSSV que no recibieron tratamiento.

En todos los tratamientos los individuos sobrevivientes presentaron una menor carga viral que los organismos muertos o moribundos (con carga viral elevada).

Los organismos que recibieron por tratamiento nanopartículas de quitosano y que vivieron al finalizar el experimento, presentaron una carga viral media, considerándolos como individuos asintomáticos ya que no manifestaron síntomas de la enfermedad.

- 4- A nivel tisular existe evidencia de cambios (núcleos hipertrofiados y cuerpos de inclusión viral) en las células de los organismos desafiados con WSSV que no recibieron ningún tratamiento comparado con los organismos que recibieron tratamiento anti-WSSV.

- 5- Es posible realizar la entrega del dsRNA vp28 en diferentes tipos de nanocontenedores para reducir posibilidades de degradación y obtener alta eficacia. Sin embargo, se sugiere hacer mejoras en los protocolos de síntesis de NPQ ya que los camarones de este tratamiento presentaron baja carga viral sin coloración rojiza, ni letargias típicas de la enfermedad causada por el WSSV lo que lo postula como un mejorador del estado de salud general del camarón. Es importante resaltar también que los costos para la producción de VLPs actualmente son mayores que los costos de producción de las NPQ. Aun cuando la activación del sistema de interferencia se ha perfilado como una de las herramientas más eficaces para impedir la replicación viral de WSSV, es deseable incrementar los porcentajes de sobrevivencia.

VI. Perspectivas

Perspectivas a corto plazo

De acuerdo con los resultados obtenidos con el desarrollo de este trabajo, se propone:

1. Dar el tratamiento por períodos más prolongados antes y después de la infección.
2. Realizar reinfecciones de WSSV posteriores a la aplicación del tratamiento antiviral.
3. Probar la eficacia con otras plataformas de entrega más rentables para la industria camaronícola.

Perspectivas a largo plazo:

1. Evaluar el estrés generado en el camarón y el nivel de absorción de las nanopartículas.
2. Estandarizar la metodología de producción y caracterización de las nanopartículas elaboradas a base de quitosano como nanocontenedor de dsRNA para combatir WSSV.
3. Realizar estudios sobre la respuesta génica para conocer y entender por completo el mecanismo de protección en camarón.

Referencias

- Apiratikul, N., Yingyongnarongkul, B. E., & Assavalapsakul, W. (2013). Highly efficient double-stranded RNA transfection of penaeid shrimp using cationic liposomes. *Aquaculture Research*, 45(1), 106–112. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03209.x>
- Booeshaghi, A. S., Beltrame, E. da V., Bannon, D., Gehring, J., & Pachter, L. (2019). Design principles for openb source bioinstrumentation: the poseidon syringe pump system as an example. *BioRxiv*, 521096.
- Calvo, P., Remuñan-López, C., Vila-Jato, J. L., & Alonso, M. J. (1997). Chitosan and Chitosan/Ethylene Oxide-Propylene Oxide Block Copolymer Nanoparticles as Novel Carriers for Proteins and Vaccines. *Pharmaceutical Research*, 14(10), 1431–1436.
- Carmona, E. R., Plaza, T., Recio-Sánchez, G., & Parodi, J. (2018). Generación de un protocolo para la síntesis de nanopartículas de quitosano cargadas con florfenicol a través del método de gelación iónica. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(4), 1195–1202. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i4.15203>
- Chandrika, S.K., & Puthiyedathu, S. T. (2021). Challenges and prospects of Viral Envelope protein VP28-based control strategies to combat white spot syndrome virus in penaeid shrimps: a review. *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 734–743. <https://doi.org/10.1111/raq.12497>
- Chang, Y. S., Liu, W. J., Lee, C. C., Chou, T. L., Lee, Y. T., Wu, T. S., Huang, J. Y., Huang, W. T., Lee, T. L., Kou, G. H., Wang, A. H. J., & Lo, C. F. (2010). A 3D Model of the Membrane Protein Complex Formed by the White Spot Syndrome Virus Structural Proteins. *PLoS ONE*, 5(5), e10718. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010718>
- Croisier, F., y Jérôme, C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49(4), 780–792. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009>

Durand, S. V., y Lightner, D. V. (2002). Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *Journal of Fish Diseases*, 25(7), 381–389. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00367.x>

Escobedo-Bonilla, C.M., Alday-Sanz, V., Wille, M., Sorgeloos, P., Pensaert, M.B. y Nauwynck, H.J. 2008. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *Journal of Fish Diseases*. 31: 1–18. doi: 10.1111/j.1365-2761.2007.00877.x.

Fan, W., Yan, W., Xu, Z., & Ni, H. (2012). Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.042>

Filee J y Chandler M (2008) Convergent mechanisms of genome evolution of large and giant DNA viruses. *Res Microbiol* 159: 325–331

Flegel, T. W. y Sritunyalucksana, K. (2011) ‘Shrimp Molecular Responses to Viral Pathogens’, *Marine Biotechnology*, 13(4), pp. 587–607. doi: 10.1007/s10126-010-9287-x.

Flegel, T. W. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(2), 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.004>

Food and Agriculture Organization (FAO). *FAO Yearbook—Fishery and Aquaculture Statistics 2018/FAO Annuaire: Statistiques des Pêches et de L’aquaculture 2018/FAO Anuario. Estadí Sticas de Pesca y Acuicultura 2018*; Food and Agriculture Organization: Rome, Italy, 2020.

Itsathitphaisarn, O., Thitamadee, S., Weerachatanukul, W., & Sritunyalucksana, K. (2017). Potential of RNAi applications to control viral diseases of farmed shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*, 147, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.11.006>

- Jariyapong, P., Chotwivatthanakun, C., Somrit, M., Jitrapakdee, S., Xing, L., Cheng, H.R., Weerachayanukul, W. (2014). Encapsulation and delivery of plasmid DNA by virus- like nanoparticles engineered from *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus. *Virus Res.* 179, 140–146.
- Jariyapong, P., Chotwivatthanakun, C., Pooljun, C., & Weerachayanukul, W. (2019). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus-like particles encapsulating VP28 double-stranded RNA protect shrimp from white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 504, 260–266. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.02.001>
- Lightner, D.V. (2011). Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. *J. Invertebr. Pathol.* 106, 110–130.
- Lightner, D., Redman, R., Pantoja, C., Tang, K., Noble, B., Schofield, P., Mohny, L., Nunan, L. and Navarro, S. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *Journal of Invertebrate Pathology*, [online] 110(2), pp.174-183. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.006>
- Lo, C.F., Ho, C.-H., Chen, C.H., Liu, K.F., Chiu, Y.L., Yeh, P.-Y., Peng, S.-E., Hsu, H.C., Liu, H.C., Chang, C.F., Wang, C.H., Kou, G.H., 1997. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organ. *Dis. Aquat. Org.* 30, 53–72.
- Lo, C., Aoki, T., Bonami, J., Flegel, T., Leu, J., Lightner, D., Stentiford, G., Söderhäll, K., Walker, P., Wang, H., Xun, X., Yang, F., Vlak, J. (2012). Family Nimaviridae. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds), *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 229-234.

- Lucas, R. W., Larson, S. B., & McPherson, A. (2002). The crystallographic structure of brome mosaic virus. *Journal of Molecular Biology*, 317(1), 95–108. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5389>
- Megías, M. P. M. (s. f.). Técnicas Histológicas. 5. Tinción. Generales. Atlas de Histología Vegetal y Animal. Recuperado 10 de septiembre de 2021, de <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/5-general.php>
- Mejía-Ruíz, C. H., Vega-Peña, S., Alvarez-Ruiz, P., & Escobedo-Bonilla, C. M. (2011). Double-stranded RNA against white spot syndrome virus (WSSV) vp28 or vp26 reduced susceptibility of *Litopenaeus vannamei* to WSSV, and survivors exhibited decreased susceptibility in subsequent re-infections. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107(1), 65–68. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.02.002>
- Millard, R. S., Bickley, L. K., Bateman, K. S., Farbos, A., Minardi, D., Moore, K., Ross, S. H., Stentiford, G. D., Tyler, C. R., van Aerle, R., & Santos, E. M. (2021). Global mRNA and miRNA Analysis Reveal Key Processes in the Initial Response to Infection with WSSV in the Pacific Whiteleg Shrimp. *Viruses*, 13(6), 1140. <https://doi.org/10.3390/v13061140>
- Nilsen, P., Karlsen, M., Sritunyalucksana, K., & Thitamadee, S. (2017). White spot syndrome virus VP28 specific double-stranded RNA provides protection through a highly focused siRNA population. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01181-w>
- Núñez-Rivera, A., Fournier, P. G. J., Arellano, D. L., Rodríguez-Hernández, A. G., Vázquez-Duhalt, R., & Cadena-Nava, R. D. (2020). Brome mosaic virus-like particles as siRNA nanocarriers for biomedical purposes. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 11, 372–382. <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.28>
- Olivas Valdez, J.A. (2008). Evaluación de la carga parasitaria del camarón cultivado en Baja California y efecto del virus de la mancha blanca (WSSV) a diferentes salinidades. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.101 pp

- Prior, S., Browdy, C.L., Shepard, E.F., Laramore, R.y Parnell, P.G., (2003). Controlled bioassay systems for determination of lethal infective doses of tissue homogenates containing taura syndrome or white spot syndrome virus. *Disease of Aquatic Organisms*. 54: 89-96.
- Ramos-Carreño, S., Giffard-Mena, I., Zamudio-Ocadiz, J. N., Nuñez-Rivera, A., Valencia-Yañez, R., Ruiz-Garcia, J., Viana, M. T., & Cadena-Nava, R. D. (2021). Antiviral therapy in shrimp through plant virus VLP containing VP28 dsRNA against WSSV. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 17, 1360–1373. <https://doi.org/10.3762/bjoc.17.95>
- Ramos-Paredes, J., Grijalva-Chon, J. M., Rosa-Vélez, J. D. L., & Enríquez-Paredes, L. M. (2011b). New genetic recombination in hypervariable regions of the white spot syndrome virus isolated from *Litopenaeus vannamei* (Boone) in northwest Mexico. *Aquaculture Research*, 43(3), 339–348. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02836.x>
- Rao SB, Sharma CP. (1997). Use of chitosan as a biomaterial studies on its safety and hemostatic potential. *J Biomed Mater Res*, 34:21.
- Richardson, S., Kolbe HV, Duncan R. (1999). Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA. *International Journal of Pharmaceutics*, 178(2), 231–243. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(98\)00378-0](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(98)00378-0)
- Robalino, J., Bartlett, T., Shepard, E., Prior, S., Jaramillo, G., Scura, E., Chapman, R. W., Gross, P. S., Browdy, C. L., & Warr, G. W. (2005). Double-Stranded RNA Induces Sequence-Specific Antiviral Silencing in Addition to Nonspecific Immunity in a Marine Shrimp: Convergence of RNAInterference and Innate Immunity in the Invertebrate Antiviral Response? *Journal of Virology*, 79(21), 13561–13571. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.21.13561-13571.2005>
- Robalino, J., Browdy, C. L., Prior, S., Metz, A., Parnell, P., Gross, P., & Warr, G. (2004). Induction of Antiviral Immunity by Double-Stranded RNA in a Marine Invertebrate. *Journal of Virology*, 78(19), 10442–10448. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.19.10442-10448.2004>

- Sambrook, J. y Russell. W. D. (2006). *The Condensed Protocols from molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New york. 800 pp.
- Sanitt, P., Apiratikul, N., Niyomtham, N., Yingyongnarongkul, B. E., Assavalapsakul, W., Panyim, S., & Udomkit, A. (2016). Cholesterol-based cationic liposome increases dsRNA protection of yellow head virus infection in *Penaeus vannamei*. *Journal of Biotechnology*, 228, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.04.049>
- Soto, M., & Lotz, J. M. (2001). Epidemiological Parameters of White Spot Syndrome Virus Infections in *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78(1), 9–15. <https://doi.org/10.1006/jipa.2001.5035>
- Sarathi, M., Simon, M. C., Venkatesan, C., & Hameed, A. S. S. (2008). Oral Administration of Bacterially Expressed VP28dsRNA to Protect *Penaeus monodon* from White Spot Syndrome Virus. *Marine Biotechnology*, 10(3), 242–249. <https://doi.org/10.1007/s10126-007-9057-6>
- Sarathi, M., Simon, M. C., Ahmed, V. P. I., Kumar, S. R., & Hameed, A. S. S. (2007). Silencing VP28 Gene of White Spot Syndrome Virus of Shrimp by Bacterially Expressed dsRNA. *Marine Biotechnology*, 10(2), 198–206. <https://doi.org/10.1007/s10126-007-9052-y>
- Stentiford, G., Neil, D., Peeler, E., Shields, J., Small, H., Flegel, T., Vlak, J., Jones, B., Morado, F., Moss, S., Lotz, J., Bartholomay, L., Behringer, D., Hauton, C., & Lightner, D. (2012). Disease will limit future food supply from the global crustacean fishery and aquaculture sectors. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(2), 141–157. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.013>
- Strugała, A., Jagielski, J., Kamel, K., Nowaczyk, G., Radom, M., Figlerowicz, M., & Urbanowicz, A. (2021). Virus-Like Particles Produced Using the Brome Mosaic Virus Recombinant Capsid Protein Expressed in a Bacterial System. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3098. <https://doi.org/10.3390/ijms22063098>

- Tang, X., Wu, J., Sivaraman, J., & Hew, C. L. (2007). Crystal Structures of Major Envelope Proteins VP26 and VP28 from White Spot Syndrome Virus Shed Light on Their Evolutionary Relationship. *Journal of Virology*, 81(12), 6709–6717. <https://doi.org/10.1128/jvi.02505-06>
- Thammasorn, T., Sangsuriya, P., Meemetta, W., Senapin, S., Jitrakorn, S., Rattanarojpong, T., & Saksmerprome, V. (2015). Large-scale production and antiviral efficacy of multi-target double-stranded RNA for the prevention of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp. *BMC Biotechnology*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0226-9>
- Tsai, J. M., Wang, H. C., Leu, J. H., Wang, A. H. J., Zhuang, Y., Walker, P. J., Kou, G. H., & Lo, C. F. (2006). Identification of the Nucleocapsid, Tegument, and Envelope Proteins of the Shrimp White Spot Syndrome Virus Virion. *Journal of Virology*, 80(6), 3021–3029. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.6.3021-3029.2006>
- Ufaz, S., Balter, A., Tzror, C., Einbender, S., Koshet, O., Shainsky-Roitman, J., Yaari, Z., & Schroeder, A. (2018). Anti-viral RNAi nanoparticles protect shrimp against white spot disease. *Molecular Systems Design & Engineering*, 3(1), 38–48. <https://doi.org/10.1039/c7me00092h>
- van Hulten, M. C. W., Goldbach, R. W., & Vlak, J. M. (2000). Three functionally diverged major structural proteins of white spot syndrome virus evolved by gene duplication. *Journal of General Virology*, 81(10), 2525–2529. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-10-2525>
- van Hulten, M.C., Vlak, J.M., (2001). Identification and phylogeny of a protein kinase gene of white spot syndrome virus. *Virus Genes* 22, 201-207.
- van Hulten, M.C., Witteveldt, J., Snippe, M., Vlak, J.M., (2001b). White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. *Virology* 285, 228-233.

- van Hulten, M.C., Reijns, M., Vermeesch, A.M., Zandbergen, F., Vlak, J.M. (2002). Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins. *J. Gen. Virol.* 83, 257-265.
- Vlak JM, Bonami JR, Flegel TW, Kou GH, Lightner DV, et al. (2005) Nimaviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editors. VIIIth report of the international committee on taxonomy of viruses. Princeton, NJ: Princeton University Press. pp. 187–192.
- Wasi, S. (2003). RNA interference: The next genetics revolution? from Horizon Symposia; Understanding the RNAissance. Nature Pub. Group, pp. 1-4. Discusses potential therapeutic applications of RNAi.
- Wang, H. C., Hirono, I., Maningas, M. B. B., Somboonwiwat, K., & Stentiford, G. (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: Nimaviridae. *Journal of General Virology*, 100(7), 1053–1054. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001248>
- Williams, T., Bergoin, M., van Oers, M.M., Diversity of large DNA viruses of invertebrates, *Journal of Invertebrate Pathology* (2016), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2016.08.001>
- Xu, J., Han, F., & Zhang, X. (2007). Silencing shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes by siRNA. *Antiviral Research*, 73(2), 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.08.007>
- Yang, F., He, J., Lin, X., Li, Q., Pan, D., Zhang, X., & Xu, X. (2001). Complete Genome Sequence of the Shrimp White Spot Bacilliform Virus. *Journal of Virology*, 75(23), 11811–11820. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.23.11811-11820.2001>
- Yi, G., Wang, Z., Qi, Y., Yao, L., Qian, J., & Hu, L. (2004). Vp28 of Shrimp White Spot Syndrome Virus Is Involved in the Attachment and Penetration into Shrimp Cells. *BMB Reports*, 37(6), 726–734. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2004.37.6.726>

Youtong, W., Deachamag, P., Phongdara, A., & Chotigeat, W. (2011). WSSV: VP26 binding protein and its biological activity. *Fish & Shellfish Immunology*, 30(1), 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.09.008>