

Optimización de un protocolo de inducción de genes inmunitarios (Dicer-2 - Argonaute-2) del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* para su establecimiento como biomarcadores potenciales en programas de mejoramiento genético.

Optimization of a protocol for induction of immune genes (Dicer-2 - Argonaute-2) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* to its establishment as potential biomarkers in breeding programs.

Tayron Vera¹, Yovani Rosales¹, Gabriel Morey², Juan Luzardo¹, Ana Mayanga², Rosario Morales², Jessica Infante², Emmerik Motte³, Eric Mialhe⁴

Resumen

Como consecuencia de las grandes pérdidas económicas ocasionadas en el sector camaronero por el brote de enfermedades, la producción de lotes de camarones SPR ha empezado a tomar auge. Es por ello que varios trabajos de investigación han identificado diferentes efectores relacionados con la respuesta inmune celular y humoral, incluyendo el sistema ARNi, a fin de establecer marcadores moleculares aplicables dentro de los programas GAS. El estudio permitió determinar el patrón de expresión de dos de los principales genes (Dicer-2 y Argonaute-2) relacionados con el sistema ARNi como respuesta inmune antiviral en *Litopenaeus vannamei*. A partir de aplicación de dos inmunostimulantes (LPS + Poly I:C) los niveles de expresión del gen Dicer-2 se incrementaron gradualmente durante las primeras 09H00 post-inducción, entre 6.5 (03H00), 8.8 (06H00) y 10.7 (09H00) veces mayores en comparación con los animales inyectados con SSC. Mientras que los niveles de expresión del gen Argonaute-2 alcanzaron un máximo pico a las 03H00 post-inducción (34.9 veces mayores que en los animales inyectados con SSC), en posteriores muestreos dichos valores disminuyeron drásticamente, pero se mantuvieron sobre expresados entre 06H00 (7.0), 09H00 (3.5) y 12H00 (1.2). Con los datos obtenidos se ha dado paso a la estandarización de un protocolo para la evaluación de los niveles de expresión de estos dos genes y su aplicación como marcadores moleculares, para la selección y el establecimiento de familias de camarones multiresistentes a infecciones virales dentro de los Programas de Mejoramiento Genético de *Litopenaeus vannamei*.

Palabras clave: SPF, SPR, GAS, ARNi, Dicer-2, Argonaute-2, LPS, Poly I:C, *Litopenaeus vannamei*.

Abstract

As a result of the great economic losses in the shrimp sector by the outbreak of diseases, the shrimp production batches SPR has begun to surge. That is why several researches have identified different effectors related to cellular and humoral immune response, including the RNAi system in order to establish molecular markers applicable within GAS programs. The study determined the pattern of expression of two key genes (Dicer-2 and Argonaute-2) RNAi system related antiviral immune response in *Litopenaeus vannamei*. After applying two immunostimulants (LPS + Poly I: C) the levels of gene expression Dicer-2 gradually increased during the first 0900 post-induction at 6.5 (03H00) 8.8 (06H00) and 10.7 (09H00) times higher compared to animals injected with SSC. While the gene expression levels Argonaute-2 reached a peak maximum at 0300 post-induction (34.9 times higher than in animals injected with SSS), in subsequent sampling these values drastically decreased but remained overexpressed between 06H00 (7.0), 09H00 (3.5) and 12H00 (1.2). With the data obtained has led to the standardization of a protocol for the evaluation of the expression levels of these two genes and their use as molecular markers for the selection and establishment of multiresistant shrimp families viral infections within breeding programs *Litopenaeus vannamei*

Key words: SPF, SPR, GAS, iRNA, Dicer-2, Argonaute-2, LPS, Poly I:C, *Litopenaeus vannamei*.

1 Marinazul S.A., Tumbes, Perú;
2 Biotec CMC, Trujillo, Perú

tvera@marinazul.com
3 Conceptazul S.A.,

yovanir@hotmail.com
4 Incabiotec SAC.

Introducción

La producción de camarones peneidos constituye uno de las actividades acuícola de mayor importancia a nivel mundial, llegando a generar cerca de 14 billones de dólares anuales (FAO 2010); no obstante, el sector camaronero ha experimentado una serie de problemas que han limitado su productividad; siendo la presencia de enfermedades infecciosas de origen viral (WSSV, IHNV, IMNV, TSV, YHV) la principal causa de las mayores pérdidas económicas. (Moon et al. 2003, Brock et al. 2005, Flegel 2006, Suttle 2007, Escobedo-Bonilla et al. 2008).

Para contrarrestar tales adversidades, en primera instancia, centró la atención en la adopción de sistemas de bioseguridad y se dio paso al cultivo preferencial de poblaciones de camarones SPF (Flegel et al. 2008); las poblaciones de camarones SPF (Specific Pathogen Free), stock de animales libres de uno o más patógenos específicos, fueron introducidos por el USMSFP (U.S. Marine Shrimp Farming Program) en camaroneras de Estados Unidos a mediados de los 90', resultando ser casi el doble de productivo que las líneas convencionales (no certificadas) (Moss et al. 2003).

Actualmente, existen poblaciones de camarones SPF, distribuidas a nivel mundial, las que son libres de WSSV, YHV, IHNV, TSV e IMNV y su cultivo ha permitido mantener la productividad del sector acuícola (Moss et al. 2012). Sin embargo, dado que el status de los animales, SPF no garantiza la producción de camarones resistentes a tales patógenos; varios autores establecieron que una de las vías potenciales para hacer frente a los brotes de enfermedades es el desarrollo de cepas de camarones SPR (Specific Pathogen Resistant).

Es importante destacar que los camarones SPR son el resultado de los programas de mejoramiento genético diseñados para incrementar la resistencia a un virus en particular, esto se logra mediante infecciones experimentales a poblaciones de camarones con un patógeno en particular (o combinación de varios patógenos) y luego

se da paso a la selección y cultivo de los individuos sobrevivientes como reproductores potenciales para el establecimiento de las siguientes generaciones (Briggs 2006).

Considerando los logros alcanzados en el campo de la Biología Molecular como la identificación de marcadores genéticos asociados con genes que afectan características de interés, incluyendo QTL (Quantitative Trait Loci) o regiones genómicas que afectan características cuantitativas (Andersson 2001); y a la implementación de programas de GAS (selección asistida por Genes), los cuales han demostrado ser más eficiente que los esquemas clásicos de selección, en particular para características que son difíciles de mejorar a partir de la selección convencional (caracteres de baja heredabilidad o rasgos cuya medición de fenotipo es costoso y sólo es posible al final de la vida del organismo) como es el caso del crecimiento y la resistencia a enfermedades infecciosas (Dekkers 2013, Meuwissen); la selección de camarones multiresistentes a enfermedades virales pronto podría llegar a ser mucho más eficiente (Jiang et al. 2004).

Los crustáceos, al igual que los organismos invertebrados, carecen de un sistema inmune adaptativo y sus mecanismos de defensa se basan exclusivamente en una respuesta inmune innata, la cual incluye componentes tanto celulares como humorales (Roch 1999). Las reacciones inmune de tipo celular conciernen procesos de fagocitosis, nodulación y encapsulación de patógenos (Zhang, Shao and Ho 2006); mientras que la respuesta humoral involucra la producción y liberación de varios efectores inmunes, tales como péptidos antimicrobianos, (AMPs), sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), proteínas inhibitoras, factores tipo citoquinas, etc. (Li and Xiang 2012); que interactúan conjuntamente para la detección y eliminación de todo tipo de microorganismos potencialmente peligrosos tales como bacterias, hongos o

virus (Jiravanichpaisal, Lee and Söderhäll, 2006).

Además de estos tipos de respuesta inmune, varios estudios han demostrado la existencia de un sistema de silenciamiento de genes que se relaciona como una respuesta inmune a infecciones virales, conocido como ARN de interferencia (ARNi) (Li and Ding 2005, Labreuche et al. 2010); caracterizado por la inhibición de la replicación del virus por supresión de la expresión de genes virales en las células infectadas (Haasnoot, Cupac and Berkhout. 2003). Este proceso es iniciado por ARN de doble cadena (ds RNA), el cual es procesado por miembros de la familia Dicer (ARNasas III) en porciones de 21-25 nucleótidos de longitud, denominados siRNA o ARN interferentes pequeños (Tijsterman and Plasterk 2004). Estos siARN son incorporados en un complejo de proteínas RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN) del cual, proteínas de la familia Argonaute forman el centro catalítico, son encargadas de hidrolizar al ARNm blanco. De esta manera, la hebra antisentido queda ensamblada al complejo RISC y dirige la degradación específica de secuencia de los ARNm blancos o represión de la traducción por medio del apareamiento de secuencias complementarias (Hannon 2002).

Tanto Dicer como Argonaute han sido reportados en camarones peneidos (Labreuche

et al. 2010, Su et al. 2008, Chen et al. 2011), y para descifrar su rol en la respuesta inmunitaria antiviral varios estudios han evaluado la abundancia de ARNm de sus respectivos genes a partir de infecciones virales; considerando, que si estas proteínas son los principales efectores de la defensa antiviral, su expresión se modificaría durante una infección con este tipo de patógenos (Yao et al. 2010). Por lo tanto, el análisis de la variabilidad individual de los patrones de expresión de los genes relacionados con los mecanismos de defensa humoral ARNi, representa una estrategia potencial para la selección asistida por genes de camarones resistentes a enfermedades virales (Marrero 2002, Flegel and Sritunyaluck-sana 2010). Para ello, es necesario el establecimiento previo de un sistema de cuantificación que permita evaluar las variaciones individuales de la expresión de los efectores de defensa inmune de crustáceos durante una infección viral.

El presente trabajo está destinado a establecer un protocolo de inducción mediante el empleo de lipopolisacáridos (LPS) y Poly I:C que permita evaluar los patrones de expresión diferencial de genes relacionados con la respuesta inmune antiviral Dicer-2 y Argonaute-2 en hemocitos del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

Materiales y Métodos.

Diseño experimental e inmunoestimulación.

Se emplearon camarones SPF del Centro de Investigación y Desarrollo de Post-larvas *Litopenaeus vannamei* – Marinazul S.A. Un total de 200 camarones (20 g) fueron distribuidos en tanques de 1 tonelada (40 camarones por tanque) y aclimatados a una salinidad de 34 ‰ y una temperatura de 24°C, durante 5 días antes de la experimentación.

Los camarones fueron inmunoestimulados mediante inyección, entre el cuarto y quinto segmento abdominal, con 50 µl de las suspensiones de LPS (T2), Poly I:C (T3)

y LPS + Poly IC (T4), preparadas en solución salina de camarón SSC (400 mM NaCl, 23 mM MgSO₄, 20 mM MgCl₂, 13 mM KCl, 8.6 mM CaCl₂, 3,6 mM NaHCO₃, y 0,37 mM NaHPO₄); adicionalmente, dos grupos de camarones, uno inyectado con 50 µl de SSC (T1) y otro sin inyectar fue mantenido como control. (Tabla 1).

A fin de determinar el patrón de expresión temporal de los genes LvDiver2, LvAgo2, se tomaron muestras de hemolinfa a diferentes intervalos de tiempo; un total de 5 camarones de cada tratamiento fueron analizados a 03H00, 06H00, 09H00, 12H00, 24H00 y 48H00 post-inducción.

Tabla 1. Diseño Experimental - Tratamientos.

Grupo	Descripción	Concentración
C 1	Sin Inducción	---
T 1	SSC	---
T 2	LPS	0.2 mg/ml
T 3	Poly IC	0.4 mg/ml
T 4	Poly I:C+ LPS	0.2 mg/ml + 0.4 mg/ml

Extracción de hemolinfa y conservación de hemocitos

La hemolinfa fue obtenida a partir del seno ventral usando jeringas de 1 ml provistas con 500 μ l de anticoagulante Solución Alse ver Modificado – MAS (27 mM Citrato de Sodio, 336 mM NaCl, 115 mM glucosa, 9 mM EDTA; pH 7.0, 4°C). Cerca de 500 μ l de hemolinfa fueron recolectados por animal, se depositaron en microtubos de 1.5 ml y fueron mantenidas a 4°C. A continuación, los hemocitos fueron separados por centrifugación a 4000 rpm por 20 minutos a 4°C, el pellet obtenido se resuspendió en 30 μ l de ARN later, se almacenaron 4°C por una hora y luego a 80°C hasta su procesamiento.

Extracción ARN totales.

Las muestras de hemocitos recolectadas fueron homogenizadas con 300 μ l de Trizol (Invitrogen, USA) y almacenadas a temperatura ambiente durante 5 min. Luego, fueron sujetas a extracción con cloroformo, precipitación con isopropanol y lavados con etanol de acuerdo al procedimiento proporcionado por el fabricante. El pellet de ARN precipitado fue resuspendido en agua en 20 μ l de agua ultra pura, y se almacenó a - 80°C.

Tratamiento con ADNasa.

El ARN total fue tratado con ADNasas para remover ADN contaminante. A cada 20 μ l de ARN extraído se adicionaron 1 μ l de ADNasa buffer (10 x), 1 μ l de MgCl₂ (100 mM) y 1.5 μ l de ADNasa I (1 U/ μ l) y se incubaron a 37°C durante 30 min; luego, para inactivar la enzima ADNasa I, las muestras fueron incubadas a 65° C durante 10 min previa adición de 1 μ l de EDTA (50 mM). Finalmente las muestras de ARN fueron almacenadas a - 80°C.

Determinación de concentración, pureza e integridad del ARN

La pureza y concentración del ARN extraído se estableció mediante análisis de densidad. Se prepararon diluciones 1:50 (ARN total: Agua ultra pura) y se midió la absorbancia a 260 nm (ácidos nucleicos) y 280 nm (proteínas). El grado de pureza del RNA se determinó a partir de la relación de absorbancia A260/280 (1.8 – 2.0); mientras que para la concentración del ARN se calculó considerando que 1 densidad óptica a 260 nm es equivalente a 40 μ g/ml.

La integridad del ARN extraído se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturizante (1.5 %). La presencia de bandas ribosomales 28S y 18S y la relación (28S:18S – 2:1) se consideró como un indicativo de un ARN de buena calidad.

RT-PCR: Síntesis ADN complementario

El ADNc fue sintetizado a partir del ARN total empleando RevertAid Reverse transcriptase junto con Primer oligo T(18) (Fermentas, USA) de acuerdo al procedimiento proporcionado por el fabricante.

Selección de genes inmunitarios.

Para evaluar los efectos del LPS y Poly I:C sobre el sistema inmunitario de *L. vannamei*, se analizó el patrón de expresión temporal de los genes Dicer-2 y Argonaute-2, considerando como control interno (gen house keeping) el gen EF1A (Factor de elongación 1- alpha) (Hauton C, et al. 2005), (Tabla 2). Los juegos de iniciadores para estos genes fueron diseñados y evaluados previamente en el centro de Investigación BIOTEC - CMC (Tumbes – Perú), el análisis de secuencias completas de Dicer-2 (5513 bp), Argonaute-2 (2633 bp) y EF1A (1547 bp) registradas para *L. vannamei* permitió generar los respectivos pares de iniciadores mediante el empleo del software Primer Blast.

Tabla 2. Iniciadores empleados en este estudio.

Gen	Iniciadores	Nº Accesión	Referencia
Dicer-2	LvDcr2F2	HQ541163	(Chen et al. 2011)
	LvDcr2R2		
Argonaute-2	LvAgo2F1	HM234690	(Labreuche et al. 2010)
	LvAgo2R1		
Factor de elongación 1- alpha	LvEF1AF2	GU136229	(Wang et al. 2011)
	LvEF1AR2		

Cuantificación de la expresión de los genes Dicer-2 y Argonaute-2.

La qPCR fue realizada en el Light Cycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Applied Science, USA), las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen total de 15 µl, conteniendo 7,5 µl de SYBR Green I Master (5X), 4,5 µl de agua ultrapura, 1 µl de ADNc y 1 µl de cada primer LvDcr2F2 y LvDcr2R2, LvAgo2F1 y LvAgo2R1, LvEfaF1 y LvEfaR1, respectivamente. El programa de la qPCR fue de 95 °C por 1 min, seguido por 45 ciclos de 95 °C por 10 s., 60 °C por 10 s., 72 °C por

10 s., y finalmente 72 °C por 1 min. Al final de cada reacción de PCR, se realizó el análisis de la curva de disociación de los productos de amplificación para confirmar que sólo un producto de PCR era amplificado y detectado.

Análisis de datos.

Después de que los valores de CP fueron medidos, el análisis de niveles de expresión relativa se realizó a partir del método de Pfaffl.

Resultados y discusión

Con la finalidad de establecer el patrón de expresión temporal de los genes Dicer-2 y Argonaute-2 en hemocitos, camarones SPF (20 g) fueron sometidos a 3 diferentes tratamientos con dos inmunoestimulantes que estaban destinados a simular infecciones de tipo bacteriana (LPS) y viral (Poly I:C). Además, se consideró un tratamiento adicional (Solución salina de camarón) para determinar la influencia del estrés ocasionado por la inyección en la expresión de estos genes; y un tratamiento control sin estimulación previa.

Tras inyectar a los animales de cada tratamiento y luego de recuperar la hemolinfa en los tiempos establecidos, no se registró mortalidades. A partir de la aplicación de los protocolos previamente descritos se obtuvo ARN de buena calidad con valores de pureza de 1.86 ± 5 (A260/280), se observaron las bandas ribosomales y las concentraciones obtenidas fueron mayores a 200 ng/µl. Todos los ARNs fueron estandarizados a una concentración final de 100 ng/µl los cuales fueron usados para la sín-

tesis de ADN complementario (ADNc) y para el desarrollo de qPCR.

Análisis de expresión de Dicer y Argonaute

El análisis de expresión de los genes Dicer-2 y Argonaute-2 se realizó a partir de cuantificaciones relativas empleando con gen control "housekeeping" el gen EF1A (Factor de elongación 1- alpha), el cual ha sido reportado por ser más estable y ha sido empleado en estudios de expresión relativa de genes inmunitarios en peneidos (Roux et al. 2002, Liu et al. 2006, Sritunyalucksana et al. 2006).

Análisis de la curva de disociación

El análisis de la curva de disociación permitió confirmar la especificidad de los iniciadores empleados, los productos amplificados en la qPCR presentaron un solo pico definido con valores de Tm esperados, propios de LvDcr2F2/R2 (81 ± 0.5 °C), LvAgo2F1/R1 (82 ± 0.5 °C) y LvEfaF2/R2 (84 ± 0.5 °C).

T1: Solución salina de camarón (SSC).

La expresión inducible de los genes Dicer-2 y Argonaute-2 fue confirmada por qPCR en hemocitos de *L. vannamei* inyectados con solución salina de camarón.

Los niveles de los transcritos de ambos genes son casi no expresados durante todo

el período de la experimentación; excepto a las 24H00 y 48H00 post-inducción, donde se registró un leve incremento en los niveles de expresión del gen Argonaute-2 entre 1,6 a 1,8 veces mayor que el control (grupo de animales no inyectados), como se observa en la figura 1.

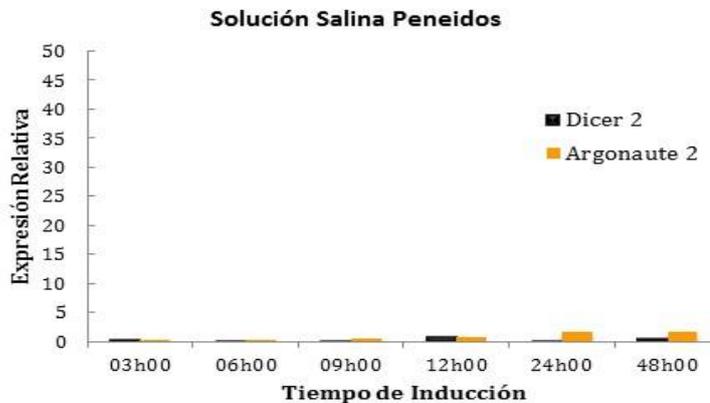


Figura 1: Expresión relativa de Dicer-2 y Argonaute-2 en hemocitos de *L. vannamei* inyectados con SSC. (EF1 α como control interno, n = 5).

Es importante destacar que la SSC constituye una solución buffer comúnmente empleada en trabajos de investigación relacionados con camarones marinos y es suministrada o incluida dentro de los grupos control o no desafiados (Okumura et al. 2005, Cheng, Wang and Chen 2005, Yao et al. 2010)

T2: Lipopolisacáridos (LPS)

Los niveles de transcritos de Dicer-2, en hemocitos de camarones inducidos con LPS, fueron levemente sobre expresados dentro de las 48 horas de experimentación, registrando un pico máximo a las 09H00 post-inducción (3.1 veces más que los animales inyectados con SSC); mientras que los transcritos de Argonaute-2 se incrementaron a las 3 horas post-inducción con LPS (11 veces más que los animales inyectados con SSC); pero en los posteriores muestreos, hasta las 09H00 fueron casi no expresados. (Figura 2).

Los Lipopolisacáridos (LPS) corresponden a un componente estructural de las membranas externas de bacterias Gram-negativas, son empleados como inmunoestimulantes debido a que poseen características altamente antigénicas (porción polisacárida)

y propiedades endotóxicas (fracción lipídica) (Cardenas, Dankert and Jenkins. 2004.). Se ha demostrado que su aplicación como inmunoestimulantes conlleva a la expresión de diversos efectores inmunes, tales como: Proteínas de unión a β -1-3-glucanos y Lipopolisacáridos (LGBP), estudios realizados por Lin, Vaseeharan and Chen. (2008) reportaron un incremento en la expresión de ARNm de LGBP a las 12 - 48 horas post-inducción con LPS en *Marsupenaeus japonicus*; así como también, la síntesis de iNOS (Jiang, Yu and Zhou); y la activación de la cascada proPO (Amparyup et al. 2012), han sido evaluadas en peneidos a partir del empleo de LPS.

Los Lipopolisacáridos (LPS) corresponden a un componente estructural de las membranas externas de bacterias Gram-negativas, son empleados como inmunoestimulantes debido a que poseen características altamente antigénicas (porción polisacárida) y propiedades endotóxicas (fracción lipídica) (Cardenas, Dankert and Jenkins. 2004). Se ha demostrado que su aplicación como inmunoestimulantes conlleva a la expresión de diversos efectores inmunes, tales como: Proteínas de unión a β -1-3-glu

canos y Lipopolisacáridos (LGBP), estudios realizados por Lin et al. (2008) reportaron un incremento en la expresión de ARNm de LGBP a las 12 – 48 horas post-inducción con LPS en *Marsupenaeus japonicus*; así

como también, la síntesis de iNOS (Jiang, Yu and Zhou 2006); y la activación de la cascada proPO (Amparyup et al. 2012), han sido evaluadas en peneidos a partir del empleo de LPS.

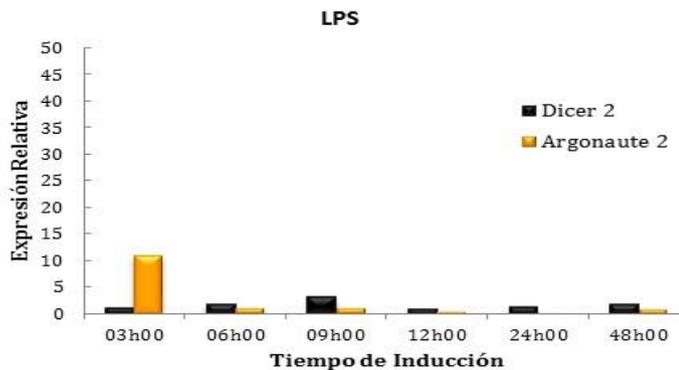


Figura 2: Expresión relativa de Dicer-2 y Argonaute-2 en hemocitos de *L. vannami* inyectados con LPS. (EF1 α como control interno, n = 5).

Además, puede inducir la síntesis de péptidos antimicrobianos similar a lo observado en células de *Drosophila* (Kim et al. 2000), principalmente Factores anti-lipopolisacáridos o ALFs. Los ALFs contienen dos residuos cisteína conservados que comprende un clúster de residuos cargados positivamente dentro de un bucle disulfuro que ha sido definido como un dominio de unión a LPS (Rosa, Stoco and Barracco 2008). La presencia de este dominio, permite a los ALFs unirse y neutralizar LPS, mostrando una fuerte actividad contra bacterias Gram-negativas (Somboonwiwat et al. 2005).

De igual manera los LGBP presentan dominios de unión a LPS y son activos contra infecciones bacterianas (Liu et al. 2009). Dichos dominios no están presentes en Dicer-2 ni Argonaute-2 y esto explicaría la razón por la cual los niveles de ambos genes se mantuvieron levemente sobreexpresados a lo largo de la experimentación. Dicer-2 y Argonaute-2 están relacionados más bien con una respuesta inmune antiviral (Labreuche et al. 2010), y no participarían directamente en el reconocimiento y en la respuesta inmune frente a inducciones con LPS.

T3: Ácido Polinosínico: Policítidilico (Poly I:C)

Los animales desafiados con Poly I:C registraron un máximo incremento en la expresi

ón de transcritos de Dicer-2 y Argonaute-2 a las 03H00 post-inducción, 3,0 y 41,2 veces mayores que en los animales inyectados con SSC, respectivamente. Sin embargo, los niveles de expresión del gen Argonaute-2, en los posteriores muestreos decayeron drásticamente, registrándose leves incrementos hasta las 09H00 post-inducción; mientras que los niveles de expresión del gen Dicer-2 se redujeron en un 50 - 60 %, manteniéndose así hasta las 24H00 post-inducción (excepto a las 12H00 en donde fue casi no expresado). (Figura 3).

A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio, se confirma el carácter inducible de Dicer-2 y Argonaute-2 mediante la aplicación de Poly I:C en hemocitos de *L. vannamei*. La sobreexpresión de Argonaute-2 registrada es similar a los resultados obtenidos por Labreuche et al. (2010), los cuales establecieron que dicho gen es sobre expresado por ARN doble cadena (> 50 pb) al ser inyectados en camarones, considerando que el ácido polinosínico: policítidilico empleado constituye un análogo sintético de ARN de doble cadena de tamaño aproximado 0,2 – 1 Kb.

Además, es necesario considerar que para el establecimiento de RISC (Complejo de Silenciamiento Inducido por ARN) en el cual Argonaute constituye el centro catalítico,

los ARN de doble cadena deben ser previamente procesados por Dicer para originar los siARN; varios autores han reportado la importancia de dichas interacciones (Dicer-Argonaute) para el desarrollo del sistema de ARN de interferencia como respuesta anti viral (Tijsterman and Plasterk 2004, Chen et al. 2011, Gregory et al. 2005, Perron and

Provost 2009). Es por ello que tras la aplicación del Poly I:C, los niveles de expresión de ambos genes fueron sobre expresados; las moléculas de Poly I:C fueron procesadas en siARN por Dicer-2 para posteriormente dar paso a la intervención de Argonaute-2 en la formación del complejo RISC.

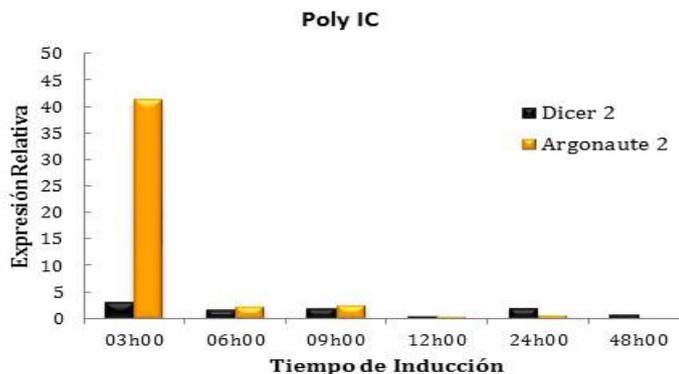


Figura 3: Expresión relativa de Dicer-2 y Argonaute-2 en hemocitos de *L. vannamei* inyectados con Poly I:C. (EF1 α como control interno, n = 5).

Sin embargo, considerando la relación entre los niveles de transcritos de Dicer-2 y Argonaute-2, en los cuales se observa una mayor expresión de Argonaute-2; es probable que el gen Dicer-2 haya sido sobre expresado en mayor magnitud dentro de las tres primeras horas post-inducción (antes del primer muestreo) o que es requerida en menor concentración, considerando que una molécula de Dicer-2 sea capaz de procesar varios ARN doble cadena y por ende dar paso a la formación de varios RISC.

T4: Lipopolisacáridos + Ácido Polinosi nico: Policitidilico (LPS + Poly I:C)

La aplicación de LPS + Poly I:C condujo a que los transcritos de Dicer-2 y Argonaute-2 se sobreexpresarán en hemocitos de *L. vannamei*, registrando valores superiores a los obtenidos en los tratamientos con LPS y Poly I:C por separado.

Los niveles de expresión del gen Dicer-2 se incrementaron gradualmente durante las primeras 09H00 post-inducción, entre 6,5 (03H00), 8,8 (06H00) y 10,7 (09H00) veces mayores en comparación con los animales inyectados con SSC; mientras que los niveles de expresión del gen Argonaute-2 alcanzaron un máximo pico a las 03H00

post-inducción (34,9 veces mayores que en los animales inyectados con SSC), en los posteriores muestreos dichos valores disminuyeron drásticamente, pero se mantuvieron sobre expresados entre 06H00 (7,0), 09H00 (3,5) y 12H00 (1,2). (Figura 4).

Al comparar los resultados obtenidos en este tratamiento con los perfiles de expresión derivados de los tratamientos con LPS y Poly I:C por separado, es posible establecer un sinergismo entre estos dos compuestos, ya que su acción combinada permitió incrementar notablemente la tasa de expresión tanto de Dicer-2 y Argonaute-2 a nivel de hemocitos.

Es importante considerar el efecto acumulativo, y eventualmente sinérgico, de la doble inducción por LPS y Poly I:C. Estos resultados pueden ser relacionados a publicaciones recientes sobre la inducción de otros genes inmunitarios, lectinas, profenoloxidasas, lisozimas, Superóxido Dismutasa manganeso citosólico (C-MnSOD) y Catalasas (CAT) utilizando similares PAMPs (laminarinas, LPS y poly I:C) en hemocitos del camarón (Ji, Yao and Wang 2009). En otras especies, poly I:C y LPS han sido mostrados por activar la expresión de

genes del sistema antiviral tal como el interferon en el humano (Reimer et al. 2008) o una interleucina en moluscos (Wu et al. 2008). Además, se ha identificado un factor de regulación del receptor Toll del camarón;

este gene, LRRFIP2 (Leucine-rich repeat flightless-I-interacting protein 2) es sobre expresado en hemocitos *L. vannamei* tras ser inducidos con LPS, poly I:C, CpG-ODN 2006 y WSSV (Zhang et al. 2013)).

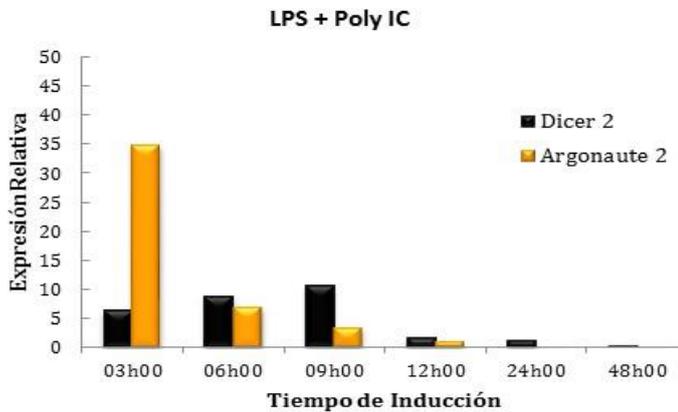


Figura 4: Expresión relativa de Dicer-2 y Argonaute-2 en hemocitos de *L. vannamei* inyectados con LPS + Poly I:C. (EF1 α como control interno, n = 5).

Experimentaciones complementarias van a permitir optimizar las concentraciones de los inmunoestimulantes, LPS y Poly I:C, individualmente y conjuntamente, para obtener inducciones óptimas.

El presente protocolo será referencia para evaluar otras moléculas inductoras del sistema ARNi, en particular ARN de doble cadena, de varios tamaños y/o secuencias como ha sido bien estudiado en insectos por Lozano et al. (2012).

Experimentos deberán ser realizados con ADN de doble cadena ya que ha sido recientemente mostrado el involucramiento de Dicer y Argonaute frente a virus de ARN mediante la inyección de ADN de doble cadena (Nowak et al. 2009), así como la generación de siRNA específicos a partir de ADN viral en el caso de WSSV (Huang and Zhang 2013).

Un primer campo de aplicación de estos marcadores moleculares del sistema ARNi corresponde al análisis por real time PCR de la diversidad genética dentro el marco de programa de mejoramiento genético para seleccionar camarones con más altos niveles de respuesta a la inducción, siendo tales animales potencialmente más resistentes a virus ADN y ARN. Además, la diver-

sidad genética de la expresión de estos genes deberá ser analizada por real time PCR de tipo HRM (High Resolución Melting) para detectar mutaciones y variantes genéticos, considerando que variaciones de secuencias en el gene Dicer han sido relacionadas a la resistencia a Arbovirus en mosquito vectores (Bernhardt et al. 2012, Lambrechts et al. 2013).

Finalmente se debe recomendar una integración del análisis de todos los genes implicados en los procesos de señalización (Toll, IMD, Relish, JAK/STAT, RIG) y de activación del sistema ARNi y de manera más global del sistema inmunitario antiviral del camarón, considerando también las informaciones muy importantes reportadas recientemente en la drosophila (Li and Xiang 2012, Tassanakajon et al. 2008, Takeuchi and Akira 2008, Thompson et al. 2008, Kawai and Akira 2007) Este proceso integrativo analítico necesitará del desarrollo de nuevas tecnologías alternativa a la real time PCR, en particular análisis cuantitativos en proteómica con equipo de tipo Maldi tof tof conveniente, para detectar, secuenciar e identificar masivamente las proteínas, así como su respectiva visualización (Fan, Wang and Wu 2013, Qiao et al. 2011).

Agradecimientos

La ejecución del estudio fue financiado por el centro de investigación (Biotec – CMC) y Fincyt fidecom (Perú), bajo la asesoría de Incabiotec S.A.C.

Conclusiones

Se establece un protocolo de inducción experimental con LPS y/o poly I:C y de evaluación cuantitativa de la expresión de los dos prin

cipales genes (Dicer-2 y Argonaute-2) relacionados con el sistema ARNi del sistema de defensa antiviral en *L. vannamei*.

Referencias Bibliográficas

- Amparyup, A., J. Sutthangkul, W. Charoensapsri and A. Tassanakajon. 2012. "A Pattern Recognition Protein Binds to Lipopolysaccharide and Beta-1,3-glucan and Activates the Shrimp Prophenoloxidase System." JBC Papers in Press. Published on January 10, 2012 as Manuscript M111.294744.
- Andersson, L. 2001. "Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals." *Nat. Rev. Genet.* 2:130–138.
- Briggs, M. R. P., S. J. F. Funge-Smith, R. P. Subasinghe and M. J. Phillips. 2006. *Introduction and movement of two penaeid shrimp species in Asia and the Pacific*. FAO Fisheries Technical Paper 426:1-104 FAO, Rome.
- Brock, J. A., R. Gose, D. V. Lightner and K. W. Hasson. 1995. *An overview of Taura syndrome, an important disease of farmed Penaeus vannamei*. San Diego, California: Editors Browdy, C. L.; Hopkins, J. S.
- Bernhardt, S. A., M. P. Simmons, K. E. Olson, B. Beaty, C. D. Blair and W. C. Black. 2012. "Rapid intraspecific evolution of miRNA and siRNA genes in the mosquito *Aedes aegypti*." *PLoS One*. 7(9):e44198.
- Cardenas, W., J. Dankert and J. Jenkins. 2004. "Flow cytometric analysis of crayfish haemocytes activated by lipopolysaccharides." *Fish & Shellfish Immunol.* 17: 223-233.
- Cheng, W., L. Wang and J. Chen. 2005. "Effect of water temperature on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio alginolyticus*." *Aquaculture* 250: 592– 601.
- Chen, Y-H., X-T. Jia, L. Zhao, C-Z. Li, S. Zhang and Y-G. Chen. 2011. "Identification and functional characterization of Dicer-2 and five single VWC domain proteins of *Litopenaeus vannamei*." *Dev Comp Immunol.* 35: 661e71.
- Dekkers J. C. M. & F. Hospital. 2002. "The use of molecular genetics in improvement of agricultural populations." *Nat. Rev. Genet.* 3:22–32.
- Escobedo-Bonilla, C. M., V. Alday-Sanz, M. Wille, P. Sorgeloos, M. B. Pensaert, H. J. Nauwynck. 2008. "A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus." *J Fish Dis* 31: 1–18.
- Flegel, T. W., D. V. Lightner, C. Lo, and L. Owens. 2008. Shrimp disease control: past, present and future. In: Bondad-Reantaso, M.G., Mohan, C.V., Crumlish, M., Subasinghe, R. (Eds.), *Diseases in Asian Aquaculture VI. Fish Health Section*. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. 355–378.
- FAO. 2010. *The State of World and Fisheries Aquaculture (SOFIA)*, Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome.
- Fan, L., A. Wang and Y. Wu. 2013. "Comparative proteomic identification of the hemocyte response to cold stress in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*." *J Proteomics*. 8:80C: 196-206.
- Flegel, T. W. 2006. "The special danger of viral pathogens in shrimp translocated for aquaculture." *Science Asia* 32: 215–231.
- Flegel, T. W., and K. Sritunyaluksana. 2010. Shrimp molecular responses to viral pathogens. *Mar Biotechnol* 13(4):587-607.
- Gregory, R. I., T. Chendrimada, N. Cooch and R. Shiekhattar. 2005. "Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing." *Cell*, 123: 631–640.
- Hannon, G. J. 2002. "RNA interference." *Nature*. 2002. 418(6894): 244-251.
- Haasnoot, P. C., D. Cupac, B. Berkhout. 2003. "Inhibition of virus replication by RNA interference." *J Biomed Sci.* 10:607e16.
- Huang, T. and X. Zhang. 2013. "Host defense against DNA virus infection in shrimp is

- mediated by the siRNA pathway". *Eur J Immunol.* 2013. 43(1):137-46.
- Ji, P. F., C. L. Yao and Z. Wang. 2009 (Oct; 27). "Immune response and gene expression in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hemocytes and hepatopancreas against some pathogen-associated molecular patterns". *Fish Shellfish Immunol.* (4): 563-70.
- Jiang, D., J. Rocha, D. Ciobanu, A. Mileham, H. van der Steen, B. White-Noble and D. V. Lightner. 2004. "Quantitative, Molecular Genetic Selection for Shrimp Disease Resistance. Genetic Improvement." *Global Aquaculture Advocate.* (2004): 52-55.
- Jiang, G., R. Yu and M. Zhou. 2006. "Studies on nitric oxide synthase activity in haemocytes of shrimps *Fenneropenaeus chinensis* and *Marsupenaeus japonicus* after white spot syndrome virus infection." *Nitric Oxide* 14 (3): 219-227.
- Jiravanichpaisal, P., B. L. Lee and K. Söderhäll. 2006. "Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization." *Immunobiology,* 211(2006):213-236.
- Kawai, T. and S. Akira. 2007. "Antiviral signaling through pattern recognition receptors." *J Biochem.* 141(2):137-45.
- Kim, Y. S., J. H. Ryu, S. J. Han, K. H. Choi, K. B. Nam, I. H. Jang, et al. 2000. "Gram-negative bacteria-binding protein, a pattern recognition receptor for lipopolysaccharide and β -1,3-glucan protein that mediates the signaling for the induction of innate immune gene in *Drosophila melanogaster* cells." *J Biol Chem* 275:32721e7.
- Lambrechts, L., E. Quillery, V. Noël, J. Richardson, R. G. Jarman, T. W. Scott and C. Chevillon. 2013. "Specificity of resistance to dengue virus isolates is associated with genotypes of the mosquito antiviral gene Dicer-2." *Proc Biol Sci.* 22; 280(1751): 20122437.
- Labreuche, Y., A. Veloso, E. De la Vega, P. Grossb, R. Chapman, C. Browdy and G. Warra. 2010. "Non-specific activation of antiviral immunity and induction of RNA interference may engage the same pathway in the Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*." *Developmental & Comparative Immunology,* 34(11): 1209-1218.
- Li, H. W. and S. W. Ding. 2005. "Antiviral silencing in animals." *FEBS Lett.* 579: 5965-5973.
- Li F. and J. Xiang. 2012. "Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp." *Fish & Shellfish Immunol.* 34(4): 973-80
- Lin, Y. C., B. Vaseeharan, J. C. Chen. 2008. "Identification and phylogenetic analysis on lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein (LGBP) of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*." *Dev Comp Immunol,* 32(11):1260-1269.
- Liu, H., P. Jiravanichpaisal, I. Soderhall, L. Cernius and K. Soderhall. 2006. "Antilipopolysaccharide factor interferes with white spot syndrome virus replication in vitro and in vivo in the crayfish *Pacifastacus leniusculus*." *J. Virol,* 80:10365-10371.
- Liu, F.S., F.H. Li, B. Dong, X. M. Wang and J. H. Xiang. 2009. "Molecular cloning and characterization of a pattern recognition protein, lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein (LGBP) from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*." *Mol. Biol. Rep.* 36: 471-477.
- Lozano, J., E. Gomez-Orte, H. J. Lee, X. Belles. 2012. "Super-induction of Dicer-2 expression by alien double-stranded RNAs: an evolutionary ancient response to viral infection?." *Dev Genes Evol.* 222(4):229-35.
- Marrero, J., G. Espinosa, M. E. Alonso and U. Bécquer. 2002. "Efecto del lipopolisacárido sobre el número de hemocitos y la producción de óxido nítrico en el camarón blanco (*Litopenaeus schmitti*)." *Rev. Invest. Mar.* 23(3):221-227.
- Meuwissen, T. H. E. 2003. Genomic selection the future of marker-assisted selection and animal breeding. In: *Marker-assisted selection: a fast track to increase genetic gain in plant and animal breeding?* 2003. FAO, Rome, Italy.
- Moon, C. H., Z. J. W. Do, S. J. Cha, W. J. Yoon, S. B. Kim, M. S. Ko. 2003. "Highly conserved sequences of three major virion proteins of a Korean isolate of white spot syndrome virus (WSSV)." *Dis. Aquat. Org* 53: 11-13.
- Moss, S. A., D. R. Moss, S. M. Arce, and C. A. Otosh. 2003. Disease prevention strategies for penaeid shrimp culture. In: Y. Sakai, J.P. McVey, D. Jang, E. McVey and M. Caesar (editors), *Proceedings of the Thirty-second US Japan Symposium on Aquaculture. US-japan Cooperative Program in Natural Resources (UJNR).* U.S. Department of Commerce, N.O.A.A., Silver Spring, MD, USA. pp. 34-46.

- Moss, S., D. Moss, S. Arce, D. V. Lightner and J. Lotz. 2012. "The role of selective breeding and biosecurity in the prevention of disease in penaeid shrimp aquaculture." *Journal of Invertebrate Pathology* 110: 247–250.
- Nowak, M., E. Wyszko, A. Fedoruk-Wyszomirska, H. Pospieszny, M. Z. Barciszewska, J. Barciszewski. 2009. "A new and efficient method for inhibition of RNA viruses by DNA interference." *FEBS J.* 276(16):4372-80.
- Okumura, T., T. Ohira; H. Katayama and H. Nagasawa. 2005. "In vivo effects of a recombinant molt-inhibiting hormone on molt interval and hemolymph ecdysteroid level in kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicas*." *Zool. Sci.* 22:317–320.
- Perron, M. P. and P. Provost. 2009. "Protein components of the microRNA pathway and human diseases." *Methods Mol Biol* 487: 369–385.
- Qiao, L., Z. Du, Y. Zhang, H. Du, L. Guo, M. Zhong, J. Cao and X. Wang. 2011. "Proteomic identification of the related immune-enhancing proteins in shrimp *Litopenaeus vannamei* stimulated with vitamin C and Chinese herbs." *Fish Shellfish Immunol.* 31(6):736-45.
- Reimer, T., M. Brcic, M. Schweizer, T. W. Jungi. 2008. "poly(I:C) and LPS induce distinct IRF3 and NF-kappaB signaling during type-I IFN and TNF responses in human macrophages." *J Leukoc Biol.* 83(5):1249-57.
- Roch, P. 1999. "Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates." *Aquaculture*, 172:125-145.
- Rosa, R., P. Stoco and M. Barracco. 2008. "Cloning and characterisation of cDNA sequences encoding for anti-lipopolysaccharide factors (ALFs) in Brazilian palaemonid and penaeid shrimps." *Fish & Shellfish Immunology*, 25: 693–696.
- Roux, M. M., A. Pain, K. R. Klimpel and A. K. Dhar. 2002. "Lipopolysaccharide and β -1,3-glucan-binding gene is unregulated in white spot virus (WSV) infected shrimp (*Penaeus stylirostris*)." *J. Virol.* 76:7140–7149.
- Somboonwivat, K., M. Marcos, A. Tassanakajon, S. Klinbunga, A. Aumelas and B. Romestand. 2005. "Recombinant expression and anti-microbial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*." *Dev Comp Immunol* 29: 841–51.
- Sritunyalucksana, K., W. Wannapapho, C. F. Lo and T. W. Flegel. 2006. "PmRab7 is a VP28-binding protein involved in white spot syndrome virus infection in shrimp." *J. Virol*, 80:10734–10742.
- Su, J., D. T. H. Oanh, R. E. Lyons, L. Leeton, M. C. W. van Hulst, S-H. Tan, et al. 2008. "A key gene of the RNA interference pathway in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*: identification and functional characterization of Dicer-1." *Fish Shellfish Immunol* 24: 223e33.
- Suttle, C. A. 2007. "Marine viruses—major players in the global ecosystem." *Nat Rev Microbiol.* 5: 801–812.
- Takeuchi, O. and S. Akira. 2008. "RIG-I-like antiviral protein in flies." *Nat Immunol*, 9(12): 1327-8.
- Tassanakajon A., K. Somboonwivat, P. Supungul, S. Tang. 2008. "Discovery of immunemolecules and their crucial functions in shrimp immunity." *Fish & Shellfish Immunology*, 34(4):954-967.
- Thompson, M. R., J. J. Kaminski, E. Kurt-Jones, K. Fitzgerald. 2011. "Pattern Recognition Receptors and the Innate Immune Response to Viral Infection". *Viruses*, 3(6), 920-940.
- Tijsterman, M. & R. H. Plasterk. 2004. "Dicers at RISC: The Mechanism of RNAi." *Cell*, 117: 1-3.
- Wang, L., Y. Liu, W. N. Wang, W. J. Mai, Y. Xin, J. Zhou, W. Y. He, A. L. Wang and R. Y. Sun. 2011. "Molecular characterization and expression analysis of elongation factors 1A and 2 from the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*." *Mol. Biol. Rep.* 38(3): 2167-2178.
- Wu, S. Z., X. D. Huang, Q. Li, M. X. He. 2013. "Interleukin-17 in pearl oyster (*Pinctada fucata*): Molecular cloning and functional characterization." *Fish Shellfish Immunol.* 34(5): 1050-6.
- Yao, C-L., P-L. Ji, Z-Y. Wang, F-H. Li, J-H. Xiang. 2010. "Molecular cloning and expression of NOS in shrimp, *Litopenaeus vannamei*," *Fish & Shellfish Immunol.* 28(3):453-460.
- Yao, X., L. Wang, L. Song, H. Zhang, C. Dong, Y. Zhang, et al. 2010. "A Dicer-1 gene from white shrimp *Litopenaeus vannamei*: expression pattern in the processes of immune response and larval development." *Fish Shellfish Immunol.* 29:565e70.

Zhang, Z. F., M. Shao and K. Ho Kang. 2006. "Classification of haematopoietic cells and haemocytes in Chinese prawn *Fenneropenaeus chinensis*." *Fish Shellfish Immunol.* 21:159-169.

Zhang, S., H. Yan, C. Z. Li, Y. H. Chen, F. Yuan, Y. G. Chen, S. P. Weng, J. G. He. 2013. "Identification and Function of Leucine-Rich Repeat Flightless-I-Interacting Protein 2 (LRRFIP2) in *Litopenaeus vannamei*." *PLoS One.* 8(2): e57456.

