

In vitro* digestibility of specific dsRNA by enzymes of digestive tract of shrimp *Litopenaeus vannamei

Digestibilidad *in vitro* del dsRNA específico por enzimas del tracto digestivo del camarón *Litopenaeus vannamei*

Ana R Álvarez-Sánchez Ph.D, Héctor Nolasco-Soria* Ph.D, Humberto Mejía-Ruíz Ph.D.

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Calle IPN 195, La Paz, B.C.S. 23096, México *Correspondence: hulasco04@cibnor.mx

Received: July 2016; Accepted: November 2016.

ABSTRACT

Objective. The digestibility of specific dsRNA by action of the enzymes of digestive tract of the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* was determined *in vitro*. **Materials and methods.** Digestive enzyme activity (amylase, lipase, protease, DNase and RNase) was measured in the stomach, digestive gland, and anterior, middle, and posterior intestine of juvenile shrimp, and the digestibility of DNA, RNA and the dsRNA-ORF89, specific to WSSV, was determined by *in vitro* assays, as well as electrophoretic and densitometric analyses. **Results.** The highest enzymatic activity was found in the digestive gland: amylase (81.41%), lipase (92.60%), protease (78.20%), DNase (90.85%), and RNase (93.14%). The highest digestive capacity against DNA, RNA, and dsRNA was found in the digestive gland (5.11 ng of DNA per minute, 8.55 ng of RNA per minute, and 1.48 ng dsRNA per minute). **Conclusions.** The highest digestibility of dsRNA-ORF89, specific to WSSV, was found in the digestive gland, whereas the lowest digestibility was observed in the posterior intestine. This is the first report regarding the digestibility of dsRNA-ORF89 by whiteleg shrimp digestive tract enzymes, with potential therapeutic importance in shrimp culture to prevent WSSV disease through balanced feed.

Keywords: Aquaculture, balanced feed, digestive gland, nucleic acids, WSSV (*Sources: MeSH, FAO*).

RESUMEN

Objetivo. La digestibilidad del dsRNA específico para el virus de la mancha blanca (WSSV) por acción de las enzimas del tracto digestivo del camarón *Litopenaeus vannamei* fue analizada *in vitro*. **Material y métodos.** Se midió la actividad de enzimas digestivas (proteasa, amilasa, lipasa, ADNasa y ARNasa) en el estómago, la glándula digestiva, el intestino anterior, medio y posterior en juveniles de camarón patiblanco y se evaluó la digestibilidad de ácidos nucleicos ADN, ARN y dsRNA-ORF89 específico contra el virus WSSV, por análisis electroforéticos y densitometría. **Resultados.** La actividad enzimática más alta se encontró en la glándula digestiva del camarón: amilasa (81.41%), lipasa (92.60%), proteasa (78.20%), ADNasa (90.85%) y ARNasa (93.14%). Se evidenció la capacidad digestiva del camarón patiblanco contra el ADN, ARN y dsRNA-ORF89 encontrando en la glándula digestiva la mayor digestión (5.11 ng de ADN por minuto, 8.55 ng de ARN por minuto y 1.48 ng de dsRNA por minuto). **Conclusiones.** La mayor digestibilidad del dsRNA-ORF89, específico contra el virus WSSV, se encontró en la glándula digestiva y la menor en el intestino posterior. Este es el primer informe relacionado con la digestibilidad del dsRNA-ORF89 por las enzimas del camarón patiblanco con potencial importancia terapéutica en el cultivo de camarón para prevenir la enfermedad del WSSV a través del alimento balanceado.

Palabras clave: Ácidos nucleicos, acuicultura, alimento balanceado, glándula digestiva, WSSV (*Fuentes: DeCS, FAO*).

INTRODUCTION

One of the most powerful tools used in aquaculture against viral pathogens such as white spot syndrome virus (WSSV) is the mechanism of RNA interference (iRNA) induced by double-stranded RNA (dsRNA) (1). For example, complete inhibition of WSSV infection was achieved in the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* through an injection of specific dsRNA against the viral protein vp28 (2). In the fleshy prawn *Fenneropenaeus chinensis*, mortality was greatly reduced by applying an injection of specific dsRNA against vp281, vp28, and kinase (PK) proteins (3). Similar results have been reported for whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* (4, 5).

Recently, the long-term antiviral effects of dsRNA-vp28, dsRNA- vp26, dsRNA-wsv191, and dsRNA-ORF89 (this last one catalogued in latency functional genes) have been studied in whiteleg shrimp *L. vannamei* infected with WSSV. The results indicated different antiviral responses against WSSV. The whiteleg shrimp *L. vannamei* treated with dsRNA-ORF89 and dsRNA-vp28 achieved a 90% survival while the shrimp treated with dsRNA-vp26 and dsRNA-wsv191 achieved a survival of 79 and 17% relative to the positive control WSSV (0%) (6), which supports the theory that the antiviral effect depends on the gene to which the block is directed (7), making dsRNA-ORF89 an excellent candidate to incorporate in shrimp feed as an antiviral additive.

Currently, dsRNA can be produced by chemical synthesis, enzymatic synthesis, and by plasmid DNA vectors (8). However, the high cost involved in producing the dsRNA, the complexity of supplying the dsRNA to organisms plus maintaining the necessary concentration for their action on target cells has limited the use of dsRNA for research purposes (9). The most common methods of administering dsRNA are by injection, immersion, or oral route (per os) (10). Each of these methods has several advantages and disadvantages; For example, direct injection has been shown to have an important antiviral effect (11). However, this method of application is costly, labor intensive and considered impractical because of the large number of organisms that need to be protected in culture ponds (12). The Immersion method has the advantage of protecting a greater number of organisms; however, its use is limited to larvae or small organisms (13). The application of oral dsRNA, produced in biological systems such as *E.coli* HT115 (14, 15) and the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* (16) make its mass application more practical by having the facility

INTRODUCCIÓN

Una de las herramientas más poderosas utilizadas en la acuicultura frente a patógenos virales como el virus de la mancha blanca (WSSV) es el mecanismo de ARN de interferencia (ARNi) inducido por ARN de doble cadena (dsRNA, por sus siglas en inglés double-stranded RNA) (1). Por ejemplo, la inhibición completa de la infección por WSSV se logró en el camarón Kuruma *Marsupenaeus japonicus* a través de la inyección de dsRNA específico dirigido contra la proteína viral VP28 (2). En el langostino carnoso *Fenneropenaeus chinensis*, la mortalidad se redujo en gran medida mediante la inyección de dsRNA específico contra vp281, VP28, y las proteínas quinasa (PK) (3). Se reportan resultados similares para el camarón patiblanco *Litopenaeus vannamei* (4,5).

Recientemente, los efectos a largo plazo de antivirales dsRNA-vp28, dsRNA- vp26, dsRNA-wsv191, y dsRNA-ORF89 (este último catalogado en los genes funcionales de latencia) se han estudiado en *L. vannamei* infectados con WSSV. Los resultados indican diferentes respuestas antivirales contra WSSV. Los camarones patiblanco tratados con dsRNA-ORF89 y dsRNA-vp28 lograron una supervivencia del 90%, mientras que, los camarones tratados con dsRNA- vp26 dsRNA-wsv191 lograron una supervivencia del 79 y 17 % respecto al control positivo a WSSV (0%) (6). Lo que apoya la teoría de que el efecto antiviral depende del gen al que se dirige el bloqueo (7). Esto hace al dsRNA-ORF89 un excelente candidato para incorporar en la alimentación de camarones, como aditivo antiviral.

Actualmente, el dsRNA puede producirse por síntesis química, síntesis enzimática, y por vectores de DNA plasmidial (8). Sin embargo, el alto costo que implica producirlo, la complejidad de suministrar el dsRNA a los organismos y mantener la concentración necesaria para su acción en las células blanco han limitado el uso del dsRNA para fines de investigación (9). Los métodos más comunes de administrar el dsRNA son por inyección, inmersión, o vía oral (*per os*) (10). Cada uno de estos métodos posee diversas ventajas y desventajas; por ejemplo, por inyección directa se ha visto un importante efecto antiviral (11) no obstante, este método de aplicación es costoso, requiere mucho trabajo y es considerado impráctico por la alta cantidad de organismos que se requiere proteger en los estanques de cultivo (12). El método de Inmersión tiene la ventaja de proteger un mayor número de organismos; sin embargo, su uso está limitado a larvas o pequeños organismos

of incorporating it into A balanced food. It is still unknown what takes place in the shrimp's digestive tract when dsRNA is added to feed to induce the iRNA mechanism.

The objective of this study was to determine what digestive enzyme activity takes place in the digestive tract of the whiteleg shrimp and test digestibility of DNA, RNA, and dsRNA-ORF89, specific against WSSV, to demonstrate resistance to digestion. To ensure that the organisms used for this study were in normal physiological conditions, the determination of the digestive enzymatic activity of proteases, amylases and lipases was included to demonstrate their presence as a physiological indicator and their higher concentration in the digestive gland, as it has been reported by other authors (Alexandre et al (17)). To our knowledge, this is the first study of the digestibility of dsRNA-ORF89 in whiteleg shrimp, focusing on its potential including dsRNA-ORF89 in feed to prevent WSSV disease.

MATERIAL AND METHODS

Enzymatic extracts from the digestive tract.

The experiment consisted of 26 healthy juvenile whiteleg shrimp at intermolt average weight of 9.7 g (± 1.7) and average size of 11.9 cm (± 0.93) obtained from the culture ponds of the Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) (24°06' N and 110°26' W). The shrimp were fed a commercial Vimifos Bumper Crop® diet (35% protein), a total of 3% biomass. The shrimp fasted for 24 hours before sampling. They were apparently healthy with hard and turgid bodies. Their appendices were intact and without stains or injury to the exoskeleton. Dissections were made in their digestive tract, separating stomach, digestive gland, and anterior, middle, and posterior intestines.

The weight of the digestive gland of each of the shrimp was recorded to estimate the Hepatosomatic index (IHS, weight of the digestive gland/total weight of the shrimp X 100) (18). The tissues of each segment were weighed and separately homogenized (Bio-Gen PRO200, PRO Scientific, Oxford, CT) with cold distilled water (0°C) in a v/w proportion of 3 mL distilled water g⁻¹ fresh tissue. Raw extracts were separated by centrifugation at 15.294 g for 10 min at 4°C (5810R, Eppendorf, Hamburg, Germany). The lipid fraction was removed and the supernatant was recovered and stored at -20°C, which was considered as crude extract for protein measurement, enzymatic activity, and *in vitro* digestibility.

(13). La aplicación de dsRNA vía oral, producido en sistemas biológicos como es el caso de la bacteria *E.coli* HT115 (14,15), y la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* (16), hace más práctica su aplicación masiva al tener la facilidad de incorporarlo a un alimento balanceado. Sin embargo, a la fecha, se desconoce lo que puede suceder en el tracto digestivo del camarón al incorporar dsRNA en un alimento, para funcionar como inductor del mecanismo de RNAi.

El objetivo de este estudio fue determinar la actividad enzimática digestiva que se lleva a cabo en el tracto digestivo del camarón patiblanco *L. vannamei* y la digestibilidad de ADN, ARN y dsRNA-ORF89, específico contra WSSV, para demostrar resistencia a la digestión. Con el fin de garantizar que los organismos utilizados para el presente estudio estuvieran en condiciones fisiológicas normales, se incluyó la determinación de la actividad enzimática digestiva de proteasas, amilasas y lipasas, para demostrar su presencia, como indicador fisiológico, y su mayor concentración en la glándula digestiva, como ha sido reportado por otros autores Alexandre et al (17).

MATERIAL Y MÉTODOS

Extractos enzimáticos del tracto digestivo.

Se utilizaron 26 organismos sanos de juveniles de camarón patiblanco *L. vannamei*, en estadio de intermuda, de un peso promedio de 9.7 g (± 1.7) y una talla promedio de 11.9 cm (± 0.93), obtenidos de los estanques de cultivo del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) (24°06' N y 110°26' W). Los camarones fueron alimentados con una dieta comercial Bumper Crop® (35% de proteína) de Vimifos, alimentados con un total del 3% de biomasa; antes del muestreo, se mantuvieron en ayuno 24 horas. Los organismos estaban aparentemente sanos, con cuerpos duros, apéndices intactos y sin manchas o lesiones en el exoesqueleto. Se realizaron disecciones del tracto digestivo, separando los tejidos estómago, glándula digestiva, intestino anterior, intestino medio e intestino posterior.

Se registró el peso de la glándula digestiva de cada uno de los camarones para estimar el índice Hepatosomático (IHS, (peso de la glándula digestiva/peso total del camarón) X100) (18). Los tejidos de cada segmento fueron pesados y homogenizados (Bio -Gen PRO200, PRO Scientific, Oxford, CT) con agua destilada fría (0°C), a una proporción v/w de 3 mL de agua destilada g⁻¹ de peso fresco de tejido. Los extractos crudos se clarificaron por centrifugación a 15.294 g durante 10 min a 4°C (5810R,

Quantification of protein. Protein concentrations in the enzyme raw extracts were quantified by the Bradford method. In glass tubes (100 mm × 15 mm), 8 μ L enzyme reagent, 792 μ L distilled water, and 200 μ L Bradford reagent were mixed and gently stirred by vortex. Absorbance was measured at 595 nm. Bovine serum albumin (05470, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was used as the protein standard.

Determining enzymatic activity. Total activity of each enzyme was calculated as average units for each specimen for each section of the digestive tract. Enzymatic capability was expressed as percent in each section based on 100% for the entire digestive tract. The specific activity of each enzyme (proteases, amylases, lipases, RNAses and DNAses) was expressed as units. mg^{-1} protein. All measurements were made in quadruplicate; blank control samples were also measured, but enzyme reagent was added after the reaction was stopped.

Protease activity was measured by the method described by Vega-Villasante et al. (19), using azocasein (1% in Tris-HCl 50 mM at pH 7.5) as substrate. Protease activity was expressed as units of protease. mg^{-1} protein. One unit of protease was defined as the quantity of enzymes required for an increase of 0.01 absorbance units at 440 $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$.

Amylase activity was measured by the method described by Vega-Villasante et al. (19), using starch (1%, in Tris-HCl 50 mM at pH 7.5) as substrate. Amylase activity was expressed as units of amylase. mg^{-1} protein. One amylase unit was defined as the quantity of enzymes required for an increase of 0.01 absorbance units at 550 $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$.

Lipase activity was measured by the method described by Versaw et al (20), using β -naphthyl caprylate as the substrate. Lipase activity was expressed as units of lipase. mg^{-1} protein. One lipase unit was defined as the quantity of enzymes required for an increase of 0.01 absorbance units at 540 $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$.

Nuclease activities (RNase and DNase) were measured by the modified method described by Michal and Schomburg (21). The procedure was: 100 μ L Tris-HCl (50 mM at pH 7.5) + 25 μ L CaCl_2 (192 mM) + 20 μ L bovine serum albumin (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; 05470, Sigma-Aldrich) + 20 μ L corresponding shrimp enzymatic extract added to a 2 mL micro-centrifuge tube. The reaction started by adding 10 μ L substrate (DNA or RNA, 245 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). The reagent mixture was shaken

Eppendorf, Hamburg, Alemania). La fracción lipídica se retiró y el sobrenadante se recuperó y almacenó a -20°C . Este fue considerado como extracto crudo para la medición de proteínas, actividad enzimática y digestibilidad *in vitro*.

Cuantificación de proteínas. La concentración de proteína de los extractos enzimáticos se cuantificó por el *método de Bradford*. En los tubos de vidrio (100 X 15 mm) se le agregaron 8 μ L de extracto enzimático, 792 μ L de agua destilada, 200 μ L del reactivo de Bradford y se agitó suavemente. Finalmente, se midió la absorbancia a 595 nm. Como estándar se utilizó albúmina de suero bovino (05470, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Determinación de actividad enzimática. La actividad total, de cada enzima, fue calculada en términos de unidades promedio por individuo, para cada sección del trato digestivo. La capacidad enzimática se expresó en términos porcentuales en cada sección del tracto digestivo. La actividad específica de cada enzima (proteasas, amilasas, lipasas, ARNasas y ADNasas) se expresó como unidades. mg^{-1} de proteína. Todas las mediciones se realizaron por cuadruplicado; muestras control también se midieron, pero se añadió el reactivo enzimático después de que se detuvo la reacción.

La actividad de proteasa se midió por el método descrito por Vega-Villasante et al (19) usando azocaseína (1% en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5) como sustrato. La actividad específica de las proteasas se expresó como el número de unidades de proteasa. mg^{-1} de proteína. Una unidad de proteasa se definió como la cantidad de la enzima requerida para incrementar 0.01 unidades de absorbancia a 440 $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$.

La actividad de amilasa se midió por el método descrito por Vega-Villasante et al (19), usando almidón (1%, en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5) como sustrato. La actividad específica de las amilasas se expresó como el número de unidades de amilasa. mg^{-1} de proteína. Una unidad de amilasa se definió como la cantidad de la enzima requerida para incrementar 0.01 unidades de absorbancia a 550 $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$.

La actividad lipasa se midió por el método descrito por Versaw et al (20), usando β -naftil caprilato como sustrato. La actividad específica de lipasa se expresó como unidades de lipasa. mg^{-1} de proteína. Una unidad de lipasa se definió como la cantidad de enzima requerida para incrementar 0.01 unidades de absorbancia a 540 $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$.

by vortex and incubated at room temperature (25°C) for 2 hours and stopped by adding 300 μL 1.17 M perchloric acid. It was set in an ice bath and later centrifuged at $20.817 \times g$ at room temperature for 10 min. The supernatant, an unprecipitated hydrolyzed fraction, was quantified in a nanophotometer (P-300, Implen, Munich, Germany). The blanks were treated in the same manner, adding enzymatic extract after the perchloric acid. Nuclease activity was expressed as the number of nuclease. mg^{-1} units. One nuclease unit was defined as the amount of enzymes required to hydrolyze one nanogram of substrate. min^{-1} .

Obtaining DNA and RNA substrates for enzyme activity and *in vitro* digestibility. For genomic DNA extraction, the method described by Hoffman-Winston (22) was used and the YeaStar RNA Kit (R1002, Zymo Research, Irvine, CA) for total RNA extraction. Both nucleic acids were isolated from the yeast *Yarrowia lipolytica*.

Synthesis of dsRNA-ORF89 (421 pb). The 421 bp dsRNA-ORF89, to be used as the substrate in the *in vitro* digestibility tests, was obtained by DNA extraction from an WSSV infected shrimp and amplified with specific oligonucleotides from the fragment ORF89, where the 421 bp fragment corresponded to a viral latency gene using specific primers (forward GAA GAA GCG CAC GAA TGA CG and reverse GCA TAA TGC AGT AGC GTC AAC GGC at 60°C). The dsRNA-ORF89 was synthesized using a transcription *in vitro* kit (Block-iT RNAi TOPO Transcription Kit, K3500-01 and K3650-01, Invitrogen, Carlsbad, CA). The PCR products of the latency gene ORF 89 were amplified and ligated with the Block-iT TOPO-T7 to promoter T7. Two reactions of secondary PCR were performed separately, mixing the first T7 and ORF 89 *forward* and *reverse*, as well as ORF89 *forward* and T7 *reverse*. Each of these amplifications produced a linear DNA strand in *forward* and *reverse* ways that were ligated to the T7 sequence, which works to shape the RNA transcription as a simple strand (ssRNA). The ssRNA transcript, forward or reverse was performed with the RNAi kit (MEGAscript T7 Transcription Kit, AM1334, Invitrogen) by incubating each strand at 37°C for 24 hours. After that, the strand was mixed in forward and reverse in equimolar concentrations and treated with DNase (AMPD1, Sigma-Aldrich) and RNase H (R6501, Sigma-Aldrich) to destroy the DNA molds and obtain only dsRNA. The dsRNA was purified with the MEGAclean Transcription Clean-Up Kit (AM1908, Ambion, Carlsbad, CA). Finally, the 421 bp dsRNA-ORF89 was quantified with a nanophotometer (2000c Nano-Drop, Thermo Scientific, Waltham, MA) and stored at -70°C until used.

Las actividades nucleasas (ARNasa y ADNasa) se midieron por el método modificado de Michal y Schomburg (21). El procedimiento fue el siguiente: en un tubo de microcentrífuga de 2 mL se adicionaron 100 μL de Tris-HCl 50 mM, pH 7.5+25 μL de CaCl_2 , 192 mM + 20 μL de albúmina bovina (1 mg. mL^{-1} ; 05470, Sigma-Aldrich) + 20 μL del extracto enzimático del camarón. La reacción se inició con la adición de 10 μL de sustrato (ADN o ARN, 245 ng. μL^{-1}). La mezcla de reacción se agitó en el vortex y se incubó a temperatura ambiente (25°C) por 2 horas. La reacción se paró con 300 μL de ácido perclórico 1.17 M. Este se puso en un baño de hielo y después se centrifugó a $20.817 \times g$ a temperatura ambiente durante 10 minutos. El sobrenadante, una fracción de hidrolizado sin precipitar, se cuantificó en un nanofotómetro (P-300, Implen, Munich, Alemania). Los controles se realizaron de la misma manera agregando el extracto enzimático después del ácido perclórico. La actividad específica nucleasa se expresó como el número de unidades de nucleasa. mg^{-1} de proteína. Una unidad de nucleasa se definió como la cantidad de la enzima requerida para hidrolizar un nanogramo de sustrato. min^{-1} .

Obtención de ADN y ARN para sustrato para la actividad enzimática y la digestibilidad *in vitro*. Para la extracción del ADN se utilizó el método de Hoffmany-Winston (22). El ARN total se aisló con el kit comercial (YeaStar RNA Kit, ECOGEN, R1001) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Ambos ácidos nucleicos fueron aislados de la levadura *Yarrowia lipolytica*.

Síntesis del dsRNA-ORF89 (421pb). La síntesis del dsRNA-ORF89 de 421pb, que se usó como sustrato en las pruebas de digestibilidad, se obtuvo a partir de la extracción de ADN de camarón infectado con el virus de la mancha blanca y de la amplificación con iniciadores específicos del fragmento ORF89: a partir de ADN de camarones positivos al virus WSSV, por medio de iniciadores específicos (*forward* GAAGAAGCGCACGAATGACG; *reverse* GCATAATGCAGTAGCGTCAACGGC; TM 60°C), se amplificó un fragmento de 421 pb correspondientes a un gen de latencia viral. El dsRNA-ORF89 fue sintetizado utilizando un kit de transcripción *in vitro* (Block-iT RNAi TOPO Transcripción Kit; Invitrogen, K3500-01 and K3650-01 Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante: los productos de PCR del gen de latencia ORF89 se amplificaron y ligaron con el Block-iT TOPO-T7 al promotor T7. Dos reacciones de PCR secundaria se realizaron por separado combinando los iniciadores *forward* y *reverse* de T7 y ORF89 así como también *forward* de ORF89 y *reverse* de T7. Cada una de estas amplificaciones produce una cadena

***In vitro* digestibility of DNA, RNA, and dsRNA-ORF89 by digestive enzymes in different sections of the shrimp digestive tract.** We used 2000 ng of the corresponding nucleic acid (DNA, RNA, or dsRNA-ORF89) for each 100 μ L of reaction volume: 14 μ L 10 \times buffer (500 mM of NaCl, 100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT at pH 7.9), 28.9 μ L distilled water, 50 μ L enzyme reagent from the corresponding section of the shrimp digestive tract. The reaction was started by adding 7.1 μ L nucleic acid substrate. The mixture was incubated at 30°C for 5 hours, taking 10 μ L samples at intervals of 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, and 300 min. Two blanks were used. The first one was similar to the procedure described, but the enzyme reagent was inactivated by heat (water bath at 95°C for 5 min).

The second blank used distilled water instead of the enzyme reagent. The samples taken at each sample time were immediately analyzed by electrophoresis in agarose gels (1% at pH 8.0) at 90 V for 30 min with molecular weight markers of 1 kb Plus marker ladder (#15615-016, Invitrogen, Carlsbad, CA). The samples were stained with nucleic acid gel stain in water (41003, Biotium, Hayward, CA) and visualized in a photodocumenter (Gel Doc EZ, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

The analyses of DNA and dsRNA-ORF89 digestion were determined with digitalized images (Image Pro Plus 7.0) Media Cybernetics, Bethesda, MD) of the total area (in pixels) of the image (23).

Nucleic acid input and auto-hydrolysis determination of enzyme reagent in the shrimp digestive tract. The reagent mixture contained 14 μ L buffer 10 \times (500 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT at pH 7.9) plus 50 μ L of the corresponding enzyme reagent from sections of the shrimp digestive tract, in a final reaction volume of 100 μ L, adjusted with distilled water. The reaction was started by adding the enzyme reagent and incubating at 30°C for 5 h, taking 10 μ L samples at 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, and 300 min. Each sample was immediately analyzed by electrophoresis in agarose gels (1% at pH 8.0 at 90 V, for 30 min).

Statistical analysis. The results of enzymatic activity and digestibility of DNA and dsRNA-ORF89 of each tissue were analyzed to one-way ANOVA. Once significant differences ($p < 0.05$) were verified, the average was determined by the Tukey multiple comparison test at 95% confidence. Statistical analyzes were performed with Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK).

lineal de ADN en sentido (*forward*) y antisentido (*reverse*) ligado a la secuencia de T7 los cuales sirven como molde para la transcripción ARN de cadena simple (ssRNA). La transcripción de las cadenas de ssRNA en sentido o antisentido se realizó con el kit comercial RNAi Kit (MEGAscript® T7 Transcription Kit, AM1334, Invitrogen™) por incubación de cada una de las cadenas durante 24 horas a 37°C. Posteriormente, se mezclaron las cadenas sentido y antisentido en concentraciones equimolares. Se les dio un tratamiento con nucleasas (ADNasa, Sigma, No. Catálogo AMPD1 y ARNasa H (R6501, Sigma-Aldrich) para destruir los moldes de ADN y cerciorarse de obtener solo dsRNA. El dsRNA se purificó con el kit comercial MEGAclean™ Transcription Clean-Up Kit (AM1908, Ambion, Carlsbad, CA) y finalmente se cuantificó utilizando un nanofotómetro (2000c Nano-Drop, Thermo Scientific, Waltham, MA), se almacenó a -70°C, hasta su uso.

Prueba de digestibilidad *in vitro* de ADN, ARN y dsRNA-ORF89, por las enzimas digestivas de las diferentes secciones del tracto digestivo del camarón. Se utilizaron 2000 ng totales de cada uno de los ácidos nucleicos (ADN, ARN y dsRNA-ORF89), para cada 100 μ L de mezcla de reacción: 14 μ L de buffer 10 \times (500 mM de NaCl, 100 mM de Tris-HCl, 100 mM de MgCl₂, 10 mM de DTT a un pH de 7.9), 28.9 μ L de agua destilada y 50 μ L del reactivo enzimático correspondiente a cada sección del tracto digestivo del camarón. La reacción se inició con la adición de 7.1 μ L de ácidos nucleicos como sustrato. La mezcla se incubó a 30°C durante 5 horas, tomando muestras de 10 μ L a intervalos de 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 y 300 min). Se usaron dos controles: el primero fue similar al procedimiento descrito previamente, pero se usó el reactivo enzimático inactivado por calor (baño de agua a 95°C, durante 5 min).

En el segundo control se utilizó solo agua destilada, en lugar de reactivo enzimático. Las muestras tomadas en cada tiempo de muestreo se analizaron inmediatamente por electroforesis en geles de agarosa (1 % a pH 8,0) a 90 V durante 30 min, con marcadores de peso molecular de 1 kb Plus (# 15615-016, Invitrogen, Carlsbad, CA). Las muestras fueron teñidas con tinción de ácido nucleico en agua (41003, Biotium, Hayward, CA) y se visualizaron en un fotodocumentador (photodocumenter, Gel Doc EZ, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Los análisis de digestión del ADN y dsRNA-ORF89 se determinaron con imágenes digitalizadas (Image Pro Plus 7.0) Medios cibernéticos, Bethesda, MD) de la superficie total (en píxeles) de la imagen (23).

RESULTS

Hepatosomatic index. The average hepatosomatic index of the shrimp for obtaining the enzyme reagent was 0.012 ($p < 0.05$). This index describes the condition of the organism that reflects its nutritional status also reflecting the processes of storage and transfer of proteins and lipids (24).

Protein concentration. Protein concentrations of the enzyme reagent of the digestive tract sections were (in $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ protein), 1.08, 1.44, 1.23, 1.17, and 1.31 for stomach, digestive gland, anterior intestine, middle intestine, and posterior intestine, respectively.

Digestive enzyme activity. The percentage distribution of the amylase, protease, lipase, DNase, and RNase activity in each of the tissues of the digestive tract of *L. vannamei* shrimp are summarized in table 1 where it is generally observed that 80% or more of the enzymatic activity is in the digestive gland. Values of 5.4 to 19.9% were found in the stomach and a significantly lower activity in the intestines. The specific activities of amylase, protease, lipase, DNase and RNase present in the digestive gland were the highest (in $\text{units}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein): amylase 2183, protease 44, lipase 147 DNase 4.7, and RNase 4.7; whereas, amylase 1196, protease 28, lipase 26, DNase 1.0, and RNase 0.69 were found in the stomach (Table 2).

Table 1. Percentage of enzyme activity in each segment of the digestive tract of whiteleg shrimp *L. vannamei*.

	Amylase	Protease	Lipase	DNase	RNase
S	17.60	19.90	6.57	7.56	5.39
DG	81.41	78.20	92.60	90.85	93.14
AI	0.64	1.27	0.31	0.88	0.63
MI	0.21	0.61	0.17	0.60	0.38
PI	0.14	0.01	0.35	0.11	0.45

Where 100% corresponds to protease = 2781.45 U, amylase = 130233.29 U, lipase = 7740.69 U, DNase = 232.36 U, and RNase = 978.07 U.

Digestibility of nucleic acids in the sections of the shrimp digestive tract. The minimum concentration of nucleic acid in the digestibility test, determined by electrophoresis visibility, was 70 ng for DNA, 50 ng of RNA and 20 ng for dsRNA-ORF89. In every case, to display nucleic acids and their digestion, 200 ng of DNA or dsRNA-ORF89 respectively were added to 1% agarose gel. The highest digestion of nucleic acids was found in the digestive gland: DNA

Determinación del aporte y autohidrólisis de ácidos nucleicos de los extractos enzimáticos del tracto digestivo del camarón. La mezcla de reactivo contenía 14 μL de buffer 10 x (500 mM NaCl, 100 mM Tris- HCl, mM MgCl_2 100, DTT 10 mM a pH 7.9) más 50 μL del reactivo enzimático correspondiente, a partir de secciones del tracto digestivo del camarón, en un volumen final de reacción de 100 μL , ajustado con agua destilada. La reacción se inició mediante la adición del reactivo enzimático y se incubó a 30°C durante 5 horas, tomando muestras de 10 μL a los 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, y 300 min. Cada muestra se analizó inmediatamente por electroforesis en geles de agarosa (1 % a pH 8,0 a 90 V, durante 30 min).

Análisis estadísticos. Los resultados de la actividad enzimática y la digestibilidad de ADN y dsRNA-ORF89 de cada tejido se analizaron con un ANOVA de una vía. Se tomó como diferencias significativas valores de ($p < 0.05$), el promedio se determinó mediante la prueba de comparación múltiple de Tukey al 95% de confianza. Los análisis estadísticos se realizaron con Statística 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK).

RESULTADOS

Índice hepatosomático. El índice hepatosomático promedio de los camarones utilizados para la obtención del reactivo enzimático, fue de 4.12 ($p < 0.05$). Este índice describe la condición del organismo el cual, refleja el estatus nutricional del organismo también refleja los procesos de almacenamiento y transferencia de proteínas y lípidos (24).

Concentración de proteína. Las concentraciones de proteínas de los reactivos enzimáticos de las diferentes secciones del tracto digestivo (en $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de proteína) fueron de 1.08, 1.44, 1.23, 1.27 y de 1.31, para estómago, glándula digestiva, intestino anterior, intestino medio e intestino posterior, respectivamente.

Actividad enzimática digestiva. La distribución porcentual de la actividad amilasa, proteasa, lipasa, ADNasa y ARNasa, en cada uno de los tejidos del tracto digestivo del camarón *L. vannamei*, se resumen en la tabla 1, donde en general se observa que el 80% ó más de la actividad de las enzimas se encuentra en la glándula digestiva; en el estómago se encontraron valores del 5.4 al 19.9 % y una actividad significativamente menor en los intestinos. Las actividades específicas de amilasa, proteasa, lipasa, ADNasa y ARNasa presentes en la glándula digestiva fueron las más altas

Table 2. Specific activity of amylase, protease, lipase, DNase, and RNase in sections of the digestive tract in whiteleg shrimp *L. vannamei*.

	Amylase	Protease	Lipase	DNase	RNase
S	1196.66 ±1.50 ^a	28.90 ±0.10 ^c	26.54 ±0.15 ^b	1.00 ±0.05 ^b	0.69 ±0.12 ^a
DG	2183.88 ±1.13 ^c	44.81 ±0.70 ^d	147.65 ±7.26 ^c	4.33 ±0.78 ^c	4.69 ±0.67 ^b
AI	263.40 ±0.81 ^a	11.16 ±0.07 ^b	7.49 ±0.26 ^a	0.64 ±0.05 ^a	0.49 ±0.06 ^a
MI	93.45 ±1.57 ^a	5.76 ±0.11 ^b	4.58 ±0.26 ^a	0.47 ±0.06 ^a	0.31 ±0.12 ^a
PI	61.44 ±0.88 ^a	0.26 ±0.27 ^a	8.98 ±0.33 ^a	0.41 ±0.04 ^a	0.36 ±0.05 ^a

S=stomach, DG=digestive gland, AI=anterior intestine, MI=middle intestine, (PI) posterior intestine. Same letters are not statistically different between segments of the digestive tract ($p>0.05$).

(5.11 ng DNA-min⁻¹) (Figure 1A), RNA (8.55 ng RNA min⁻¹) (Figure 1B), and dsRNA (1.48 ng of dsRNA.minute⁻¹) (Figure 1C). In general, the digestive activity of the stomach was less than 50% of that found in the digestive gland. In contrast, the digestive activity against DNA, RNA and dsORF-89 was considerably lower in the posterior gut. The electrophoretic analysis indicated the digestion of 421bp dsRNA when it was exposed to the enzymatic reagent of the digestive tract. In the stomach a light digestion of the substrate (421bp dsRNA) was found at 300 min, indicating a relatively low RNAase III activity. In contrast, in the digestive gland a strong digestion of the substrate was observed at 30 min and its complete digestion at 120 min, indicating a relatively high hydrolytic activity on the dsRNA-ORF89. In the upper intestine, a slight hydrolysis of the substrate was observed at 240 min indicating relatively low hydrolytic activity on the dsRNA-ORF89. In the middle intestine, a slight digestion of the substrate was observed at 300 min, indicating a relatively low hydrolytic activity on the dsRNA-ORF89. Finally, in the posterior intestine, poor hydrolysis of the substrate at 300 min indicated the lowest digestive capacity on the dsRNA-ORF89 (Figure 2). In summary, in lanes 2 and 3 corresponding to the inactivated enzyme and distilled water controls respectively, in all cases the dsRNA-ORF89 substrate (421 bp) maintained intact from 0 to 300 min of treatment. In contrast, when the active enzyme reagent (lane 1) was exposed, a decrease in band intensity of the dsRNA-ORF89 was observed; Particularly with the treatment of the digestive gland.

On the other hand, the electrophoretic analysis of the enzymatic reagents allowed to demonstrate that the nucleic acid bands (of molecular weight

(en unidades.mg⁻¹ de proteína): amilasa 2183, proteasa 44, lipasa 147 ADNasa 4.7, y ARNasa 4.7; mientras que, en el estómago se encontró: amilasa 1196, proteasa 28, lipasa 26, ADNasa 1.0, y ARNasa 0.69 (Tabla 2).

Digestibilidad de los ácidos nucleicos en las secciones del tracto digestivo del camarón.

La concentración mínima de ácido nucleico en el ensayo de digestibilidad, determinado por visibilidad en electroforesis, fue de 70 ng de ADN, 50 ng de ARN y 20 ng para dsRNA-ORF89. En todos los casos, para visualizar los ácidos nucleicos y su digestión, se añadió 200 ng de ADN, ARN y dsRNA-ORF89, respectivamente a un gel de agarosa al 1%. La mayor digestión del ácidos nucleicos se encontró en la glándula digestiva: ADN (5.11 ng de ADN.minuto⁻¹) (Figura 1A), ARN (8.55 ng de ARN.minuto⁻¹) (Figura 1B), y dsRNA (1.48 ng de dsRNA.minuto⁻¹) (Figura 1C). En general, la actividad digestiva del estómago fue menor al 50% de la encontrada en la glándula digestiva. En contraste la actividad digestiva contra ADN, ARN y dsORF-89 fue considerablemente menor en intestino posterior.

El análisis electroforético indicó la digestión del dsRNA de 421pb cuando fue expuesto al reactivo enzimático del tracto digestivo. En el estómago se encontró una ligera digestión del sustrato (dsRNA de 421pb) a los 300 min, lo que indicó una relativa baja actividad ARNasa III. En contraste, en la glándula digestiva se observó una fuerte digestión del sustrato a los 30 min y su completa digestión a los 120 min, lo que indicó una relativa alta actividad hidrolítica sobre el dsRNA-ORF89. En el intestino anterior, se observó una ligera hidrólisis del sustrato a los 240 min lo que indicó una relativa baja actividad hidrolítica sobre el dsRNA-ORF89. En el intestino medio, se observó una ligera digestión del sustrato a los 300 min, lo que indicó una relativa baja actividad hidrolítica sobre el dsRNA-ORF89. Finalmente, en el intestino posterior, la escasa hidrólisis del sustrato a los 300 min indicó la más baja capacidad digestiva sobre el dsRNA-ORF89 (Figura 2). En resumen, en los carriles 2 y 3 que corresponden a los controles con enzima inactivada y de agua destilada, respectivamente, en todos los casos el sustrato dsRNA-ORF89 (de 421 pb), se mantiene intacto desde los 0 a los 300 min de tratamiento. En contraste, se demostró que cuando se expone al reactivo enzimático activo (carril 1), se observó una disminución de la intensidad de la banda del dsRNA-ORF89; particularmente con el tratamiento de la glándula digestiva.

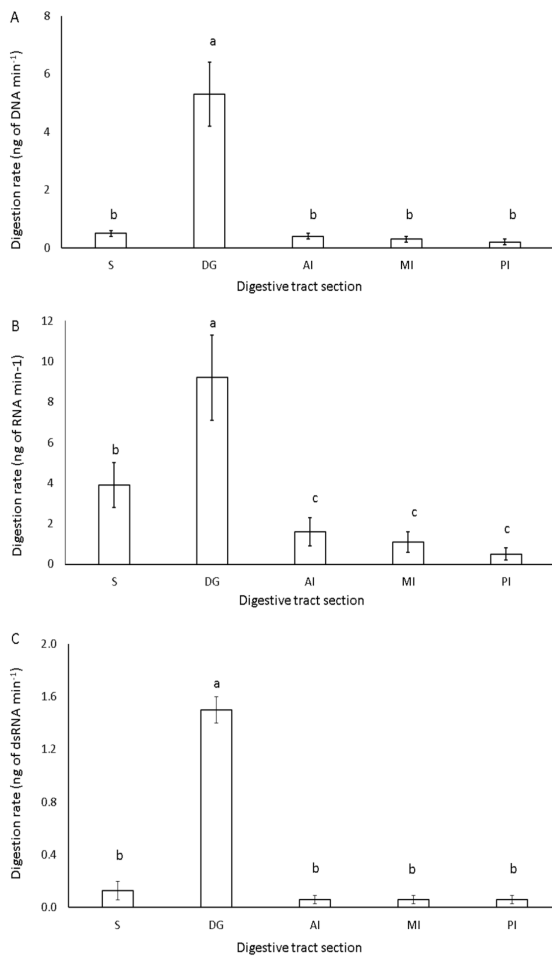


Figure 1. Digestibility of nucleic acids in the digestive tract sections of whiteleg shrimp *L. vannamei*. (A) DNA Digestion rate, (B) RNA Digestion rate, (C) dsRNA. Same letters are not statistically different ($p > 0.05$).

less than 421 bp), which appear in lane 1 at time “zero” (Figure 2) in the treatment with Digestive gland, are supplied by the enzyme reagent itself. It was also demonstrated that these nucleic acids present in the enzymatic reagents were also hydrolysed by shrimp nucleases (data not shown).

DISCUSSION

Distribution of enzyme activity in the sections of the digestive tract of whiteleg shrimp (*L. vannamei*) was determined as a percentage of enzyme activity of the entire digestive tract. All digestive enzymes (protease, amylase, lipase, and nucleases) are found in greater quantity in the digestive gland. These results coincide

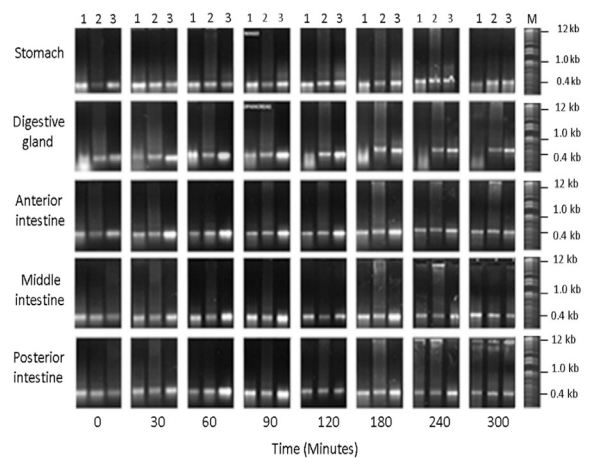


Figure 2. dsRNA-ORF89 digestion, with enzyme reagent from sections of the digestive tract of whiteleg shrimp *L. vannamei*. M = MW marker, 1 kb plus DNA Ladder. 1=Reaction mixture (RM) composed of buffer + dsRNA-ORF89 + enzyme reagent. 2=RM with inactivated shrimp enzyme reagent (100°C for 5 min). 3=RM with distilled water and dsRNA-ORF89.

Por otro lado, el análisis electroforético de los reactivos enzimáticos, permitió demostrar que las bandas de ácidos nucleicos (de peso molecular menor a 421 pb), que aparecen en carril 1 en el tiempo “cero” (Figura 2) en el tratamiento con la glándula digestiva, son aportados por el propio reactivo enzimático. Asimismo se demostró que estos ácidos nucleicos presentes en los reactivos enzimáticos fueron también hidrolizados por las nucleasas del camarón (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

Se determinó la distribución de la capacidad enzimática, en porcentaje de unidades de enzima, en las secciones del tracto digestivo del camarón patiblanco (*L. vannamei*). Todas las enzimas digestivas (amilasas, lipasas, proteasas y nucleasas) se encuentran en mayor cantidad en la glándula digestiva. Estos resultados coinciden con los reportados por Alexandre et al (17), quienes encontraron una alta actividad de proteasa en la glándula digestiva (2.300 mU), seguido por el estómago (200 mU), intestino anterior (150 mU), intestino medio (40 mU) y el intestino posterior (10 mU) (valores aproximados). Hernández y Murueta (25) mostraron que las enzimas proteolíticas más importantes, responsables de > 60% de la digestión de proteína, que se produce en la glándula digestiva, son tripsina y quimotripsina. Becerra et al (26) mostraron alta actividad de la amilasa y tripsina en la glándula digestiva. Nuestros resultados de la

with those reported by Alexandre et al (17), where they found a high protease activity in the digestive gland (2,300 mU), followed by the stomach (200 mU), the anterior gut (150 mU), the middle intestine (100 mU) and the posterior gut (10 mU) (approximate values). Hernández and Murueta (25) showed that the most important proteolytic enzymes responsible for > 60% of protein digestion, which occurs in the digestive gland, are trypsin and chymotrypsin. Becerra et al (26) showed high activity of amylase and trypsin in the digestive gland. Our results on the presence and distribution of enzymatic activity in the digestive tract of shrimp showed that the shrimp used were in normal physiological conditions (27). On the other hand, since the potential form to supply the dsRNA-ORF89 to the shrimp is its inclusion in the pelleted food, the enzymatic degradation of the starches, lipids, and proteins (which constitute the food), will favor the release of the dsRNA in the shrimp digestive tract. The hepatosomatic index of the shrimp (4.12) used also indicates a normal developmental status of the shrimp, which is within the ranges reported for other marine and freshwater crustaceans, such as *Litopenaeus vannamei* (3.0 to 4.0) (27), *Penaeus chinensis* (3.4 to 6.7) (28) and *Macrobrachium olfersii* (1.4 to 9.9) (18).

Nucleases also participate in digestion, thus we observed that total and partial degradation of nucleic acids (DNA, RNA and dsRNA) exposed to the enzyme reagent had higher enzyme activity on the RNA (8.55 ng of RNA.minute⁻¹) and to a lesser extent on the dsRNA-ORF89 (1.48 ng of dsRNA.minute⁻¹). Other studies have reported that expression of non-specific nucleases occurs in the digestive gland of *Penaeus japonicus* and tiger shrimp *Penaeus monodon* (29), where zymographic analysis shows that they degrade as much DNA as RNA, according with our results. The results of the digestibility of dsRNA-ORF89 in the digestive tract of the shrimp, reduce the possibilities of its inclusion of naked form (without protection). This information is important to design an adequate vehicle to incorporate specific dsRNA, so that it retains its antiviral property when passing through the digestive tract. Potential vehicles for the delivery of dsRNA, to reduce their hydrolysis in the digestive tract of shrimp, include nanocarriers based on cationic liposomes (nano and micro encapsulation systems), which because of their amphipathic nature are more permeable in the Phospholipid membrane of the cells, favoring the entrance of the specific dsRNA (30,9). Another option is the preparation of microencapsulates based on cationic polysaccharides such as chitosan (15, 12).

presencia y distribución de la actividad enzimática en el tracto digestivo del camarón demostraron que los camarones utilizados se encontraban en condiciones fisiológicas normales (27). Por otro lado, dado que la potencial forma para suministrar el dsRNA-ORF89 al camarón es su inclusión en el alimento peletizado, la degradación enzimática de los almidones, lípidos y proteínas (que constituyen el alimento), favorecerá la liberación del dsRNA en el tracto digestivo del camarón. El índice hepatosomático de los camarones (4.12) utilizados indica también un status de desarrollo normal de los mismos, encontrándose dentro de los intervalos reportados para otros crustáceos marinos y de agua dulce, como *Litopenaeus vannamei* (3.0 a 4.0) (27), *Penaeus chinensis* (3.4 a 6.7) (28) y *Macrobrachium olfersii* (1.4 a 9.9) (18).

Las nucleasas también participan en la digestión, es por ello que se observó degradación total y parcial de los ácidos nucleicos (ADN, ARN y dsRNA) expuestos al reactivo enzimático donde se notó mayor actividad enzimática sobre el ARN total (8.55 ng de ARN.minuto⁻¹) y en menor medida sobre el dsRNA-ORF89 (1.48 ng de dsRNA.minuto⁻¹). En otros trabajos se han reportado nucleasas no específicas en la glándula digestiva del camarón japonés *Penaeus japonicus* y el camarón tigre *Penaeus monodon* (29), donde el análisis zimográfico muestra que las nucleasas inespecíficas de la glándula digestiva degradan tanto ADN como ARN, en concordancia con nuestros resultados. Los resultados de la digestibilidad de dsRNA-ORF89 en el tracto digestivo del camarón, reducen las posibilidades de su inclusión de forma desnuda (sin protección). Esta información es importante para diseñar un vehículo adecuado para incorporar dsRNA específico, de modo que conserve su propiedad antiviral cuando pase a través del tracto digestivo. Los potenciales vehículos para el suministro del dsRNA, para reducir su hidrólisis en el tracto digestivo del camarón, incluye a los *nanocarriers* basados en liposomas (sistemas de nano- y micro-encapsulación) catiónicos, que debido a su naturaleza anfipática son más permeables en la membrana fosfolipídica de las células, favoreciendo el ingreso del dsRNA específico (9,30). Otra opción es la preparación de microencapsulados a base de polisacáridos catiónicos como el quitosano (15,12).

La estabilidad del dsRNA dependerá de la duración de la exposición a las enzimas digestivas. Nuestros controles experimentales (dsRNA con enzima inactivada y dsRNA expuesto a agua destilada) indicaron una fuerte estabilidad del dsRNA específico (ORF89), incluso después de cinco horas a 30°C (Figura 2, carriles 2 y 3). Esto sugiere que solo la actividad de la ARNasa III, principalmente en la glándula digestiva, puede degradar moléculas de esta naturaleza (dsRNA)(31).

The stability of dsRNA will depend on the duration of exposure to digestive enzymes. Our experimental controls (dsRNA with inactivated enzyme and dsRNA exposed to distilled water) indicated a strong stability of the (ORF89) specific dsRNA after five hours at 30° C (Figure 2 lanes 2 and 3), suggesting that only the RNAsa III activity, mainly in the digestive gland, can degrade molecules of this nature (dsRNA) (31). It will depend on food digestion time with the dsRNA in the digestive tract of the shrimp which, depends on the species, size, and other factors, such as temperature (21) for example, in whiteleg shrimp, digestion, and elimination lasts ~3 hours in juveniles (and even less in smaller shrimp) (32). The amount of dsRNA-ORF89 in feed and the quantity of ingested feed will be important factors for success in a WSSV treatment (6). The amount of specific dsRNA recommended for the antiviral effect to take effect from the feed should be 5-10 times greater than that injected (11,15,33). Feed containing dsRNA-ORF89 must be capable of bringing an optimal concentration to the target organs and cells; i.e., the sites of primary WSSV replication, such as the epithelial cells in the anterior intestine in the digestive tract, and in the gills (34). To include dsRNA-ORF89 in the food, it is necessary to solve some technological problems, for example, mass production of dsRNA, its recovery, purification, encapsulation (to avoid its degradation), and inclusion in the food or to use the same biological production system (Microbial cells) as inclusion vehicle (8,9).

Hydrolysis of dsRNA-ORF89 by digestive enzymes can contribute to understanding the difference between the effectiveness of injected and orally supplied dsRNA. For example, dsRNA directed to the endogenous Gen β -actin in the giant tiger prawn *P. monodon* caused death (100%) when applied by injection (25 μ L shrimp saline solution containing the various dsRNA purified from bacteria). In contrast, no deaths were reported when dsRNA was orally administered in food with bacteria expressing specific dsRNA (6.0×10^{10} bacteria/g, extruded feed with β -actin-dsRNA) (35). Similar results were observed when silencing the viral gene of the associated virus of the gills (GAV) of the giant tiger prawn with bacteria expressing specific dsRNA (4.9×10^{10} bacteria/g extruded feed of GAV-dsRNA) where survival was 97% by injection and 15–35% by oral administration (36). A similar diminished effect, by applying dsRNA-vp28 (Structural gene of the WSSV virus cell envelope) in the diet was found by Sarathi (7,8) when 25 μ g VP28-dsRNA was administered intramuscularly or orally in food supplemented with chitosan and bacteria expressing VP28-dsRNA (1×10^9 bacteria/mL);

Esto dependerá del tiempo de digestión de los alimentos con el dsRNA en el tracto digestivo del camarón, el cual varía de acuerdo a la especie de camarón, su tamaño y de otros factores como la temperatura; por ejemplo, en el camarón patiblanco *L. vannamei* la digestión total es de aproximadamente 3 horas (incluso menor en camarones pequeños) (32). La cantidad de dsRNA-ORF89 incorporado en el alimento y la cantidad ingerida puede ser un factor importante en el éxito del tratamiento para WSSV (6). La cantidad de dsRNA específico recomendada para que el efecto antiviral tenga efecto desde el alimento deberá ser 5-10 veces mayor que la inyectada (11,15,33).

El alimento que contenga el dsRNA-ORF89 debe ser capaz de llevar una concentración óptima a las células y órganos blancos; por ejemplo, los sitios de replicación primaria del virus WSSV como lo son las células epiteliales del intestino anterior del tracto digestivo, y en branquias de camarón (34). Para incluir el dsRNA-ORF89 en el alimento se requiere resolver algunas problemáticas tecnológicas por ejemplo, la producción masiva del dsRNA, su recuperación, purificación, encapsulación (para evitar su degradación) e inclusión en el alimento o bien utilizar el mismo sistema de producción biológica (células microbianas) como vehículo de inclusión (8,9).

La hidrólisis encontrada del dsRNA-ORF89 por las enzimas de la glándula digestiva puede ayudar a entender las diferencias reportadas entre la efectividad del dsRNA inyectado y el suministrado por vía oral. Por ejemplo, el dsRNA dirigido al gen endógeno β -actina del camarón *P. monodon* fue capaz de causar la muerte (al 100%) cuando se aplicaba por inyección (25 μ l de solución salina de camarón, que contiene los diversos dsRNA purificados a partir de bacterias). Mientras que, no se reportaron mortalidades cuando se administró el dsRNA por vía oral en alimento administrado con bacterias que expresaba dsRNA específico (6.0×10^{10} bacterias/g de alimento extruido con β -actin-dsRNA) (35). Resultados similares fueron observados al silenciar el gen viral del virus asociado a las branquias (GAV) del camarón *P. monodon* con bacterias que expresaban dsRNA específico (4.9×10^{10} bacterias/g de alimento extruido con GAV-dsRNA) donde la supervivencia fue del 97% por inyección, y del 15–35% por administración oral (36).

Un efecto similar mediante la aplicación de dsRNA-vp28 (gen estructural de la envoltura celular del virus WSSV) en la dieta puede observarse en los trabajos realizados por Sarathi et al (7 y 8) quienes aplicaron 25 μ g de dsRNA-vp28 intramuscularmente, mientras oralmente utilizaron alimento con quitosan y bacterias que expresaban VP28-dsRNA (1×10^9

survival was 65% against challenge with WSSV using injection and 37% survival with oral treatment. Treerattrakool et al (36) silenced the gonad inhibitor hormone (GIH) in the giant tiger prawn when dsRNA-GIH was injected intramuscularly (0.3 µg dsRNA-GIH/g shrimp), but only 50% in shrimp fed a diet containing *Artemia salina* enriched with the bacteria *E. coli* dsRNA-GIH (120 OD₆₀₀). Although the highest antiviral effect observed occurs in organisms to which the specific dsRNA was administered by injection, its usefulness in the field is null because of the high percentage of organisms that are required to be protected, so oral administration remains the best option for dsRNA even though the antiviral effect is lower.

Due to the above, our results indicate that it will be necessary to place the dsRNA-ORF89 in a protective vehicle to decrease its degradation and maintain its protective activity against WSSV.

Acknowledgments

The authors are thankful to CIBNOR staff Aldo Valadez Dorado, Baudelio García, and Carlos Romo for technical support; Patricia Hinojosa and Carmen Rodríguez for their help in the Comparative and Functional Genomics Laboratory and Histology Laboratory; Diana Dorantes and Ira Fogel for editorial services in English. This Project was funded by CIBNOR (AC 0.24) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, FINNOVA 172151). A.R.A.S. is a scholarship recipient (CONACYT, 217.533).

bacterias/mL), logrando una alta eficiencia de supervivencia contra un reto del virus WSSV en los camarones tratados por inyección (65%), respecto a los que se les aplicó el dsRNA de manera oral (37%). Treerattrakool et al (36) observaron un silenciamiento de la hormona inhibidora de la gónada (GIH) en *P. monodon* cuando se aplicó dsRNA-GIH por inyección intramuscular (0.3 µg de dsRNA-GIH/g de camarón), pero sólo el 50% de los camarones alimentados con una dieta de *Artemia salina* enriquecida con la bacteria de *E. coli* de dsRNA-GIH (120 OD₆₀₀). A pesar que el mayor efecto antiviral observado se da en organismos a los cuales el dsRNA específico fue administrado por inyección su utilidad en campo es nula por el alto porcentaje de organismos que se requiere proteger por lo que la administración oral sigue siendo la mejor opción para administrar el dsRNA aunque el efecto antiviral sea menor.

Por lo anterior, nuestros resultados indican que será necesario colocar al dsRNA-ORF89 en un vehículo protector para disminuir su degradación y mantener su actividad protectora contra el WSSV.

Agradecimientos

Agradecemos a Aldo Valadez Dorado, Baudelio García y Carlos Romo por el apoyo técnico; Patricia Hinojosa y Carmen Rodríguez por su ayuda en los laboratorios Fisiología Comparada y Genómica Funcional y el laboratorio de Histología; Diana Dorantes e Ira Fogel por sus servicios de edición. Todos del CIBNOR. Este proyecto fue financiado por el CIBNOR (AC 0.24) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, FINNOVA 172151). A.R.A.S. es un beneficiario de una beca (CONACYT, 217.533).

REFERENCES

1. Taju G, Madan N, Abdul-Majeed S, Raj-Kumar T, Thamizhvanan S, Otta S, Sahul-Hameed AS. Immune responses of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), to bacterially expressed dsRNA specific to VP28 gene of white spot syndrome virus. *J Fish Dis* 2015; 38(5):451-465.
2. Sudhakaran RT, Mekata T, Kono M, Inada S, Okugawa M, Yoshimine T et al. Double-stranded RNA-mediated silencing of the White Spot Syndrome Virus VP28 gene in Kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Aquac Res* 2011; 42(8):1153-1162.
3. Kim CS, Kosuke Z, Nam YK, Kim SK, Kim KH. Protection of shrimp (*Penaeus chinensis*) against white spot syndrome virus (WSSV) challenge by double-stranded RNA. *Fish Shellfish Immunol* 2007; 23(1):242-246.
4. Xu J, Han F, Zhang X. Silencing shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes by siRNA. *Antiviral Res* 2007; 73(2):126-131.

5. Robalino J, Bartlett T, Shepard EF, Prior S, Jaramillo G, Scura E, et al. Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to non-specific immunity in marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response? *J Virology* 2005; 79(21):13561–13571.
6. Escobedo-Bonilla CM, Vega S, Mejia H. Efficacy of double-stranded RNA against white spot syndrome virus (WSSV) non-structural (orf89, wsv191) and structural (vp28, vp26) genes in the Pacific white shrimp. *J ksus* 2015; 27(2):182–188.
7. Sarathi M, Simon MC, Venkatesan C, Thomas J, Ravi M, Madan N, et al. Efficacy of bacterially expressed dsRNA specific to different structural genes of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in protection of shrimp from WSSV infection. *J Fish Dis* 2010; 33(7):603–607.
8. LaFauce K, Owens L. RNA interference with special reference to combating viruses of crustacean. *Indian J Virol* 2012; 23(2):226–243.
9. Papić L, García K, Romero J. Avances y limitaciones en el uso de los dsRNA como estrategias de control y prevención de enfermedades virales en sistemas acuícolas. *Lat Am J Aquat Res* 2015; 43(3):388–401.
10. Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohmmmed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol. Mol Biol Rev* 2003; 67(4):657–685.
11. Posiri P, Ongvarrasopone C, Panyim S. A simple one-step method for producing dsRNA from *E. coli* to inhibit shrimp virus replication. *J Virol Meth* 2013; 188(2):64–69.
12. Plant KP, LaPatra SE. Advances in fish vaccine delivery. *Dev Comp Immunol* 2011; 35(12):1256–1262.
13. Linggatong GR, Hernandez EP, Talactac MR, Maeda H, Kusakisako K, Umemiya R, Fujisaki K, Tanaka T. Induction of gene silencing in *Haemaphysalis longicornis* ticks through immersion in double-stranded RNA. *Ticks Tick Borne Dis* 2016; 7(5):813–816.
14. Sarathi M, Simon MC, Ahmed I, Kumar SR, Sahul-Hameed AS. Silencing vp28 gene of white spot syndrome virus of shrimp by bacterially expressed dsRNA. *Mar Biotechnol* 2008a; 10(2):198–206.
15. Sarathi M, Simon MC, Venkatesan C, Sahul-Hameed AS. Oral administration of bacterially expressed vp28 dsRNA to protect *Penaeus monodon* from white spot syndrome virus. *Mar Biotechnol* 2008b; 10(3):242–249.
16. Somchai P, Jitrakorn S, Thitamadee S, Meetam M, Saksmerprom V. Use of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* for production of double-stranded RNA against shrimp virus. *Aquacult Rep* 2016; 3(3):178–183.
17. Alexandre D, Ozório R, Derner R, Fracalossi D, Oliveira G, Richard I, Walter R, Silva CP. Spatial distribution of digestive proteinases in the midgut of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) indicates the existence of endo-ectoperitrophic circulation in Crustacea. *Comp Biochem Physiol B* 2014; 173(10):90–95.
18. Magalhães T, Mossolin CE, Mantelatto FL. Gonadosomatic and Hepatosomatic indexes of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae) from São Sebastião Island, Southeastern Brazil. *Pan-Am J Aquat Sci* 2012; 7(1):1–9.
19. Vega-Villasante F, Nolasco H, Civera R. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*. I- Properties of amylase activity in the digestive tract. *Comp Biochem Physiol B* 1993; 106(6):547–550.
20. Versaw WK, Cuppert SL, Winter DD, Williams LE. An improved colorimetric assay for bacterial lipase in non-fat dry milk. *J Food Sci* 1989; 54(6):1557–1558.
21. Michal G, Schomburg D, editores. *Biochemical pathways: an atlas of biochemistry and molecular biology*. 2nd ed. New Jersey: John Wiley & Sons; 2012.
22. Hoffman CS, Winston F. A ten- minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 1987; 57(3):267–272.
23. Rodríguez-Jaramillo C, Hurtado MA, Romero-Vivas E, Ramírez JL, Manzano M, Palacios E. Gonadal development and histochemistry

- of the tropical oyster, *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) during an annual reproductive cycle. *J Shellfish Res* 2008; 27(5):1129-1141.
24. Castex M, Chim L, Pham D, Lemaire P, Wabete N, Nicolas JL, Schmidely P, Mariojouis C. Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. *Aquaculture* 2008; 275(4):182-193.
 25. Hernández JC, Murueta JH. Activity of trypsin from *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 2009; 290(4):190-195.
 26. Becerra MJ, Martínez PM, Martínez LR, Rivas ME, López JA, Porchas MA. Production response and digestive enzymatic activity of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) intensively pregrown in microbial heterotrophic and autotrophic-based systems. *ScientificWorldJournal* 2012; 2012(3):1-6.
 27. Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Olvera-Novoa MA, Civera-Cerecedo R. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuicola V. Mérida, Yucatán, México; 2000.*
 28. Sheng LC, We IZ, De SL, Cong HY. Profile of progesterone and estradiol in hepatopancreas, ovary, and hemolymph of shrimp *Penaeus chinensis* during reproduction cycle. *J Fish China* 2012; 25(4):304-310.
 29. Molthathong S, Senapin S, Klinbunga S, Puanglarp N, Rojtinnakorn J, Flegel TW. Down-regulation of defender against apoptotic death (DAD1) after yellow head virus (YHV) challenge in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol* 2008; 24(2):173-179.
 30. Shim MS, Kwon YJ. Efficient and targeted delivery of siRNA *in vivo*. *FEBS J* 2010; 277(23):4814-4827.
 31. Lamontagne B, Larose S, Boulanger J, Elela S. The RNase III family: A conserved structure and expanding functions in eukaryotic dsRNA metabolism. *Curr Issues Mol Biol* 2001; 3(4):71-78.
 32. Lemos D, Ezquerro JM, Garcia FL. Protein digestion in penaeid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. *Aquaculture* 2000; 186(2):89-105.
 33. Ongvarrasopone C, Chomchai E, Panyim S. Antiviral effect of PmRab7 knock-down on inhibition of Laem-Singh virus replication in black tiger shrimp. *Antiviral Res* 2010; 88(1):116-8.
 34. Varela A, Peña N. El Virus del Síndrome de las Manchas Blancas (WSSV): una revisión y su impacto en la camaronicultura costarricense. *Rev Costa Rica Cienc Vet* 2010; 28(2):51-69.
 35. Sellars MJ, Rao M, Arnold SJ, Wade N, Cowley J. *Penaeus monodon* is protected against gill-associated virus by muscle injection but not oral delivery of bacterially expressed dsRNAs. *Dis. Aquat* 2011; 95(1):19-30.
 36. Treerattrakool S, Chartthai C, Phromma-in N, Panyim S, Udomkit A. Silencing of gonad-inhibiting hormone gene expression in *Penaeus monodon* by feeding with GIH dsRNA enriched Artemia. *Aquaculture* 2013; 404(1):116-121.