

Review

Avances y limitaciones en el uso de los dsRNA como estrategias de control y prevención de enfermedades virales en sistemas acuícolas

Ljubomir Papić¹, Katherine García² & Jaime Romero²

¹Doctorado en Acuicultura, Programa Cooperativo Universidad de Chile
Universidad Católica del Norte, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile

²Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile
Avda. El Líbano 5524, Santiago, Chile

Corresponding autor: Jaime Romero (jromero@inta.cl)

RESUMEN. El desarrollo de la acuicultura sustentable es acorde con la demanda creciente de nuevas metodologías que aseguren la salud de las diversas especies acuícolas. Dentro de ellas, el uso de terapias revolucionarias basadas en RNA de doble cadena (dsRNA) ha abierto una amplia gama de posibilidades en el progreso de las estrategias de control y prevención de enfermedades. El sistema de silenciamiento génico mediante RNA de interferencia (RNAi) presenta un interesante potencial para el control de enfermedades infecciosas en sistemas de acuicultura. Por otro lado, se ha visto que los dsRNA pueden tener un importante efecto inmunomodulador en células de peces activando mecanismos de defensa inmune innata. La definición de un adecuado sistema de suministro para asegurar el ingreso de los dsRNA a la célula objetivo ha resultado en pruebas medianamente exitosas. Sin embargo, el cómo suministrar el dsRNA para asegurar el ingreso al organismo en su hábitat natural, se presenta como la principal dificultad de esta tecnología. Este trabajo presenta una completa revisión del potencial del silenciamiento post-transcripcional mediado por dsRNA, como estrategia antiviral en peces de cultivo y de su potencial uso como inmunoestimulante, enfatizando la necesidad de buscar metodologías que permitan suministrar el dsRNA al organismo objetivo, considerando las limitaciones y particularidades de un sistema de cultivo intensivo.

Palabras clave: RNA de doble cadena, RNA de interferencia, inmunoestimulante, antiviral, respuesta interferón, acuicultura.

Progress and limitations of dsRNA strategies in the control of viral diseases in aquaculture

ABSTRACT. The development of a sustainable aquaculture is consistent with a growing demand for new methods to ensure the health of various aquatic species. Among them, the use of revolutionary therapies based on double-stranded RNA (dsRNA) has opened a wide range of possibilities in the progress of the control strategies and disease prevention. The system of gene silencing by RNA interference (RNAi) has an interesting potential for the control of infectious diseases in aquaculture systems. On the other side, it has been found that dsRNA can have a significant immunomodulatory effect in fish cells, activating innate immune defense mechanisms. The definition of a suitable delivery system to ensure the entry of dsRNA to the target cell has results in moderately successful assays. However, the delivery of dsRNA to ensure the entry to the organism in its natural habitat is the main difficulty of this technology. This work presents a comprehensive review of potential post-transcriptional silencing by dsRNA as antiviral strategy in fish farming and its potential use as an immunostimulant, emphasizing the need to seek methodologies to deliver dsRNA into the target organism, considering the limitations and characteristics of a system of intensive farming.

Keywords: double stranded-RNA, RNA interference, immunostimulant, antiviral, interferon response, aquaculture.

INTRODUCCIÓN

La acuicultura se ha convertido en un dinámico sector productivo en los últimos años, y es responsable de satisfacer en gran parte la demanda mundial por alimentación (Plant & LaPatra, 2011; FAO 2012). En el 2011, la actividad pesquera y la acuicultura produjeron aproximadamente 154 millones de toneladas de peces a nivel mundial, de los cuales 131 millones se destinaron a alimentación (FAO, 2012). En este escenario, resulta indispensable abordar cualquier problema que pueda amenazar esta actividad. Las enfermedades de los organismos cultivados resulta ser uno de los principales inconvenientes (Plant & LaPatra, 2011). A la fecha, existen varios compuestos antibióticos y antiparasitarios, que se utilizan para el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias y parásitos, sin embargo, tratamientos efectivos contra virus no se encuentran fácilmente (Plant & LaPatra, 2011). Distintos tipos de virus amenazan a la acuicultura, entre ellos, en la industria de salmónidos destacan el virus que provoca la anemia infecciosa del salmón (ISAV, del inglés infectious salmon anemia virus) (Nylund *et al.*, 2007), el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV, del inglés infectious pancreatic necrosis virus) (Guy *et al.*, 2006), el virus de la necrosis hemato-poyética infecciosa (IHNV, del inglés infectious hematopoietic necrosis virus) (Thoulouze *et al.*, 2004), el virus de la septicemia hemorrágica (VHSV, del inglés viral hemorrhagic septicemia virus) (Kim *et al.*, 2012), o en la industria del camarón, el virus que genera el síndrome de la mancha blanca (WSSV, del inglés white spot syndrome virus) (Sarathi *et al.*, 2008). Para controlar esta amenaza, en la actualidad se trabaja con ayuda de la biotecnología y herramientas de ingeniería genética para desarrollar estrategias y terapias que permitan abordar este problema.

Una de estas tecnologías que concita mayor interés últimamente, es la del RNA de interferencia (RNAi) (Lima *et al.*, 2013). El RNAi es un mecanismo de silenciamiento post-transcripcional descubierto en la última década, donde el RNA de doble cadena (dsRNA) proveniente de una región codificante o un gen, es introducido a un organismo, resultando en la degradación específica de un mRNA complementario al interior de la célula (Provost *et al.*, 2002). Este silenciamiento post-transcripcional se encuentra bien conservado evolutivamente en varios organismos eucariontes, permitiendo proteger a la célula contra virus a través de un ataque altamente específico, basado en la generación de cadenas pequeñas de RNAs interferentes de 21 a 28 nucleótidos (Shuey *et al.*, 2002; Almeida & Allshire, 2005; Aagard & Rossi, 2007).

Por otro lado, también se ha puesto atención en el posible efecto inmunomodulador que podrían tener los dsRNA utilizados como adyuvantes en vacunas para inducir la estimulación del sistema inmune innato (Ruyra *et al.*, 2013; Thim *et al.*, 2014). Los adyuvantes mejoran la respuesta humoral y celular (Ruyra *et al.*, 2013), siendo los dsRNA un candidato para potenciar este proceso. En este contexto, los dsRNA representan una novedosa alternativa enfocada a mejorar la salud de los peces.

En esta revisión se abordan los mecanismos de acción del dsRNA y sus posibles aplicaciones como terapia antiviral y/o inmunomodulador en acuicultura, con especial énfasis en las dificultades de suministro que deben ser superadas para asegurar la presencia del dsRNA en la célula del organismo blanco.

dsRNA como sustrato de la vía de RNA interferencia

En los organismos eucariontes, la exposición intracelular a una secuencia de dsRNA desencadena un proceso de silenciamiento post-transcripcional secuencia-específico en un mRNA homólogo. La ruta del RNAi se inicia con el ingreso de un dsRNA activador de cadena larga al interior de la célula, que rápidamente se corta en pequeños trozos de 21 a 28 pares de bases mediante la acción de la enzima Dicer (ribonucleasa III) que tiene la particularidad de reconocer y cortar el dsRNA en lugares específicos (Provost *et al.*, 2002; Shuey *et al.*, 2002; Aagard & Rossi, 2007). Estos pequeños trozos de dsRNA se denominan RNAi pequeños, o siRNA por su acrónimo en inglés small interference RNA. Esta enzima posee un dominio helicasa, sugiriendo la necesidad de que el dsRNA activador deba desenredarse antes del ataque enzimático (Shuey *et al.*, 2002). Los siRNA son incorporados a un complejo de silenciamiento de RNA llamado RISC. (del acrónimo en inglés multi-subunit RNA-induced silencing complex), donde la proteína argonauta (Ago) es uno de los principales componentes (Zamore *et al.*, 2000). Esta hidrólisis del mRNA ocurre entre las regiones homólogas del siRNA, permitiendo una selectividad a la hora de hidrolizar (Fig. 1) (Shuey *et al.*, 2002). La eficiencia del proceso de hidrólisis del mRNA no está aún bien descrita, sin embargo, entre las que se describen como variables son el tamaño del siRNA, y la estructura secundaria del mRNA y en consecuencia, la accesibilidad para la operación del complejo RISC (Aigner, 2006).

Producción de dsRNA

Para producir dsRNA *in vitro*, básicamente existen tres estrategias: síntesis química, síntesis enzimática *in vitro* y vectores de DNA plasmidial. Cada uno de estos métodos posee diversas ventajas y desventajas (La Fauce & Owens, 2012).

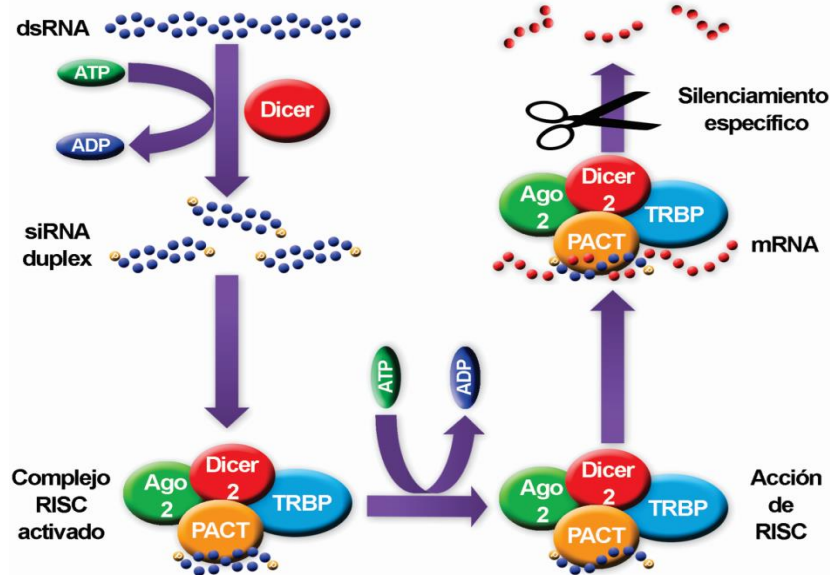


Figura 1. Modelo simplificado del sistema de silenciamiento génico con RNAi a partir de un dsRNA que ingresa a la célula, resultando en la hidrólisis del mRNA objetivo. El dsRNA se muestra al inicio como círculos pequeños de color azul entrelazados, simulando una doble hebra. Este dsRNA es reconocido por Dicer, la cual procesa esta molécula generando pequeños RNAs de doble cadena (small interference RNA duplex o siRNA duplex). Posteriormente, estos siRNA duplex son reconocidos por el complejo RISC (multi-subunit RNA-induced silencing complex) activado, compuesto por varias proteínas (Ago2, Dicer 2, PACT, TRBP), el cual denatura la doble cadena del siRNA y degrada una de las hebras, dejando la otra unida al complejo (ver en figura acción de RISC). Si la hebra que queda unida a RISC es complementaria a un RNA mensajero (mRNA, círculos pequeños rojos que simulan una hebra simple), se produce la hibridación de ambas hebras por complementariedad de bases y, en consecuencia el complejo RISC procede a la degradación del mRNA, generando un silenciamiento específico de la expresión del gen.

Los dsRNAs que se sintetizan en forma química son introducidos directamente en el citoplasma de la célula evitando el paso por la enzima Dicer. Debido a su tamaño se les denomina siRNAs. Estos siRNAs pueden ser sintetizados en grandes cantidades y se ha probado que son más eficientes en gatillar una degradación del mRNA secuencia-específica. Sus principales desventajas son el alto costo económico y tiempo de síntesis lo que no lo hace factible para producciones a gran escala, más aún si múltiples siRNAs están involucrados (Duxbury & Whang, 2004).

Los dsRNAs generados enzimáticamente involucran una transcripción *in vitro* mediada por la polimerasa del fago T7 (Donze & Picard, 2002). Como producto de la transcripción se obtienen pequeños RNAs repetidos invertidos que se denominan *small hairpin RNAs* (shRNAs), que son subsecuentemente cortados por Dicer. Es el método más rápido y más rentable para la síntesis de siRNA. Sin embargo la pureza y especificidad usando este tipo de síntesis es variable y se puede obtener resultados de una inhibición no específica en la expresión génica (Duxbury & Whang, 2004).

El uso de vectores como los plásmidos de DNA que poseen el promotor de la polimerasa III, también pueden ser utilizados para generar dsRNAs para silenciamiento génico (Sui *et al.*, 2002). Los dsRNAs son producidos y subsecuentemente procesados por Dicer en siRNAs. El uso de estos plásmidos que generan dsRNAs, permite su expresión estable por al menos 2 meses post-transfección y es más económico al generar múltiples secuencias que son obtenidas por la propia maquinaria de RNAi, sin requerir de un procesamiento externo que aumente los costos de producción. Su principal desventaja es que el éxito es dependiente del proceso de transfección (Duxbury & Whang, 2004).

Otra de las estrategias utilizadas es generar dsRNAs utilizando sistemas *in vivo*. En este caso el uso de bacterias recombinantes, resulta una buena opción como sistemas de producción, debido a su fácil manipulación, rápido crecimiento en medios de cultivos adecuados y capacidad de contener plásmidos en su interior (Timmons & Fire, 2001; Terpe, 2006; Solís *et al.*, 2009; Posiri *et al.*, 2013). En el caso de *Escherichia coli*, además de estas características, se

utiliza una cepa que posea una mutación en el gen que codifica para RNasa III para evitar la hidrólisis enzimática del material genético acumulado. La cepa más utilizada es la *E. coli* HT115 (DE3), ya que posee características idóneas para ocuparlas como máquinas productoras de dsRNA, además de expresar una RNA T7 polimerasa que permite expresar RNAs a partir de plásmidos que poseen doble promotor T7 (Fig. 2) (Timmons & Fire, 2001; Sarathi *et al.*, 2008; Posiri *et al.*, 2013). De manera general, luego de la construcción del plásmido recombinante, como el pL4440 (Timmons & Fire, 1998), la bacteria productora se transforma mediante shock térmico, electroporación o mediante el uso de químicos. Posteriormente, mediante técnicas de cultivo, *E. coli* HT115 crece exponencialmente hasta que se induce la expresión de la RNA T7 polimerasa (que se encuentra bajo el control de un promotor inducible) con isopropil-1,1-tio- β -D-galactopiranosido (IPTG) o lactosa, para iniciar la producción de dsRNA (Fig. 2) (Sarathi *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2009).

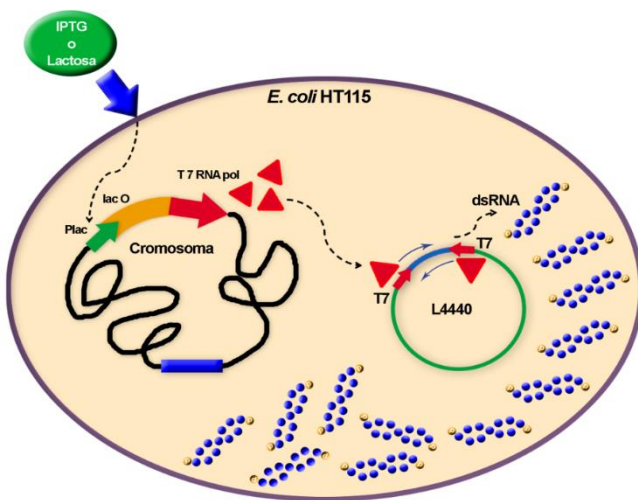


Figura 2. Esquema general de la producción del dsRNA en la bacteria *E. coli* HT115. La expresión de la RNA polimerasa T7 (triángulos rojos), codificada en el cromosoma de *E. coli* HT115 bajo el control del operon *lac*, es inducida por la adición de IPTG o lactosa (círculo verde ubicado al exterior de la bacteria que es representada como el óvalo azul). La RNA polimerasa reconoce ambos promotores T7 presentes en el plásmido L4440 (círculo verde), que están orientados en forma inversa, y procede a la síntesis de los RNA de doble cadena (pequeñas hebras representadas por círculos azules entrelazados que simulan una doble cadena), los cuales mediarán el proceso de interferencia.

Cada uno de los métodos descritos posee una serie de ventajas y desventajas, sin embargo, pensando en una producción a gran escala como la que se necesitaría en sistemas de cultivo acuícola intensivos, la estrategia que utiliza sistemas *in vivo* representa la opción más

fácil, rápida y económicamente viable de producir los dsRNA.

RNAi como una estrategia promisoría en el control *in vitro* de enfermedades virales que afectan a la acuicultura

El RNA interferente es una estrategia que se ha utilizado ampliamente para entender la función de los genes y es una metodología promisoría para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas y antivirales (Gavrilov & Saltzman, 2012). Dentro de ellas se ha sugerido el desarrollo de terapias orientadas al tratamiento de enfermedades virales y parásitos en organismos acuáticos (Lima *et al.*, 2013). A la fecha se han obtenido reportes exitosos que han utilizado el RNAi contra el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) (Sarathi *et al.*, 2008). Esta enfermedad es responsable de pérdidas económicas severas en la industria del camarón a nivel mundial, causando 100% de mortalidad en cultivos de camarón entre 3-4 días (Lightner, 1996). El WSSV posee un gen, VP28, el cual codifica para una de las proteínas estructurales del virus y está involucrado en la adhesión y penetración en las células de camarón. En los estudios de Sarathi y sus colaboradores (Sarathi *et al.*, 2008), este gen fue utilizado como blanco del dsRNA antiviral sintetizado por bacterias *E. coli* HT115 (DE3). Experimentos con microscopía de fluorescencia y ELISA mostraron que VP28dsRNA fue capaz de silenciar la expresión del gen VP28, previamente clonado en un plásmido eucarionte y transfectado en la línea celular SISK, una línea celular continua derivada de riñón de lubina.

De igual forma, otros estudios llevados a cabo *in vitro* (Ruiz *et al.*, 2009; Kim & Kim, 2011; Kim *et al.*, 2012) han sugerido que sería posible controlar otra enfermedad, la septicemia hemorrágica viral, combatiendo su agente causal, el virus VHSV mediante el uso de RNAi. Este virus, posee un genoma RNA de simple hebra de polaridad negativa y pertenece a la familia *Rhabdoviridae* y es el causante de una de las enfermedades virales más importantes que se produce en una amplia variedad de especies de peces silvestres y de cultivo a nivel mundial. Kim *et al.* (2012) utilizaron un vector con doble promotor U6 de fuga, el cual genera una producción continua de dsRNAs largos en células EPC, una línea celular de epiteloma derivado de carpa, previamente transfectadas. Los dsRNA que utilizan como blanco el gen G de VHSV, el cual codifica para glicoproteína, suprimen la expresión de este gen. Al impedirse la producción de glicoproteína se obtienen partículas virales incompletas, y en consecuencia, se inhibe la proliferación de VHSV en cultivo de EPC. Esta supresión depende exclusivamente de la maquinaria de interferencia, ya que los RNAi no afectan la expresión de genes relacionados con la

activación de la vía de interferón, es decir, su acción ocurre por el apagamiento de la expresión génica del gen G y no por efectos secundarios inespecíficos del dsRNA. Además esta protección es secuencia específica, ya que solo se inhibe la infección con VHSV pero no de otros virus como el IHNV en cultivo celular. Este estudio demostró que dsRNA largos median el mecanismo de interferencia en células de peces, y podrían ser utilizados para el análisis de la función génica en células de peces además de ser aplicados como estrategia antiviral (Kim *et al.*, 2012).

Los últimos estudios han mostrado también la factibilidad de utilizar dsRNA para inhibir *in vitro* la replicación viral del Ciprinido herpes virus-3, CyHV-3 (Gotesman *et al.*, 2013). CyHV-3 es el agente etiológico del herpesvirus, que causa altas mortalidades (tasa de 80-100%) y afecta a la carpa común y carpa koi (*Cyprinus carpio L.*) (Hedrick *et al.*, 2000; Ilouze *et al.*, 2006). Esta enfermedad ha sido listada como notificable en Alemania desde 2005 y por la Organización Mundial de la Salud Animal desde 2007 (Gotesman *et al.*, 2013). En este estudio, se analizó la posibilidad de activar la vía de RNAi utilizando pequeños RNAs interferentes (siRNAs) para probar la inhibición viral *in vitro* de CyHV-3 en células de cerebro de carpa común (línea celular common carp brain, CCB). Los siRNAs fueron diseñados contra los genes timidina quinasa (*tk*) y DNA polimerasa (*dp*), que codifican para transcritos involucrados en la replicación. La inhibición de la replicación viral se midió por qPCR siguiendo la detección del gen reportero ORF81. El tratamiento de siRNA contra *tk* o *dp* permitió la reducción en la liberación de partículas virales desde células CCB infectadas *in vitro* con CyHV-3. El tratamiento más efectivo se obtuvo al silenciar el gen DP de acuerdo a la medición de ORF81 por qPCR. Este ensayo preliminar estableció las bases para el uso de RNAi para el control de CyHV-3 (Gotesman *et al.*, 2013). Recientemente, nuestro grupo ha probado con éxito la efectividad de esta estrategia contra ISAv (García *et al.*, 2015).

RNAi como terapia antiviral *in vivo* en peces

Diversos organismos eucariontes presentan variados mecanismos de defensa como una protección natural frente a infecciones virales, lo que les permite detectar y combatir a estos patógenos. El dsRNA presente en el genoma del virus, o generado durante la replicación, es reconocido por el organismo hospedero como un patrón inequívoco de la infección viral, generando una variada respuesta inmune (Lima *et al.*, 2013). En los últimos años se han publicado trabajos que dan cuenta de una efectiva estrategia contra infecciones virales utilizando dsRNA exógenos en distintos organismos; en vegetales

frente a tobamovirus y potivirus (Tenllado *et al.*, 2003; Yin *et al.*, 2009), mamíferos desafiados con virus de hepatitis B y C (Aagard & Rossi, 2007), crustáceos infectados con el virus de la cabeza amarilla (Posiri *et al.*, 2013) o con el virus de la mancha blanca (Sarathi *et al.*, 2008, 2010) y peces frente al virus hemorrágico de la carpa, virus de la necrosis nerviosa, iridovirus, virus de la septicemia hemorrágica viral (Kim *et al.*, 2012), entre otros (Schlyth *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2013).

Los problemas por enfermedades virales en peces pueden ser una dificultad en bancos naturales de este recurso, pero pueden tener un devastador efecto en sistemas de acuicultura. Un claro ejemplo de esto es lo ocurrido con la industria del salmón en Chile durante 2008 y 2009 con el brote de virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV) (Mardones *et al.*, 2011). Si bien los estudios de la actividad antiviral del RNAi en peces, principalmente han aportado una abundante evidencia en líneas celulares *in vitro* (Tabla 1), es necesario realizar más ensayos de campo con peces sometidos a condiciones reales de cultivo.

Como se detalla anteriormente, en los estudios realizados *in vitro*, se ha sugerido la existencia de la maquinaria que posibilita el silenciamiento génico mediante RNAi y por tanto, su potencial antiviral. En desafíos de *Gobiocypris rarus* frente a reovirus de carpa hervibora (GCV, grass carp reovirus), se ha observado por RT-PCR cuantitativo en tiempo real que el nivel de transcrito de Dicer incrementa significativamente en el periodo temprano de la infección viral y disminuye desde las 24 h post-infección (hpi). El mRNA de Dicer vuelve a los niveles de expresión del control a las 48 hpi. Al observar por microscopía electrónica de transmisión, los viriones fueron difícilmente observados a las 12 hpi, pero se observaron partículas virales desde las 24 hpi. Estos resultados sugieren que la vía de RNAi es activada en estados tempranos de la infección (Su *et al.*, 2009). Por otro lado, el *knockdown* de Dicer-1 en *Penaeus monodon* resulta en mortalidades incrementadas y elevados títulos virales, sugiriendo que el mecanismo de RNAi se encuentra activo (Kitagishi *et al.*, 2011). Los altos niveles de expresión de Dicer en órganos linfoides son consistentes con un rol en la respuesta de defensa del camarón. En el caso de *Litopenaeus vannamei*, se conoce que Dicer-2 está involucrada en la inmunidad antiviral no específica y en algún grado soporta la relación sugerida entre activación de la inmunidad antiviral y la inducción de RNAi. Se ha propuesto que Dicer-2 podría contribuir a la activación de la inmunidad antiviral no específica aumentando la potencia y eficacia del RNAi (Kim *et al.*, 2005). Sin embargo, se requiere más estudios que permitan identificar los componentes de la vía de RNAi en cama-

Tabla 1. Algunos estudios de aplicación de RNAi como terapia antiviral en acuicultura.

Célula u organismo	Gen objetivo	Método de suministro	Virus	Resultado principal	Referencia
Embriones de trucha arcoíris	<i>GFP</i>	Micro- inyección	–	siRNAs suprimen efectivamente la expresión transiente de GFP localizado episomalmente, en un estado de desarrollo temprano y en embriones de truchas transgénicas	Bonanuntanasarn <i>et al.</i> (2003)
Células musculares de <i>Pimephales promelas</i>	<i>Proteína de cápside</i>	Transfección	Iridovirus tiger frog virus	Silenciamiento específico del gen reportero lacZ en células FHM por expresión de shRNAs desde plásmidos o por siRNAs transfectados. Silenciamiento de proteína mayor de cápside e inhibición de la replicación viral en células HeLa con siRNAs específicos	Xie <i>et al.</i> (2005)
Embriones de salmón chinook	<i>Nucleoproteína-N</i>	Transfección	Rabdovirus. Septicemia hemorrágica viral	27-25 mer dsRNAs. Reducen el nivel de expresión génica viral y la replicación viral en forma específica en cultivo celular <i>in vitro</i>	Bohle <i>et al.</i> (2011)
Células de epiteloma de carpa	<i>L-polimerasa</i>	Transfección	Rabdovirus. Septicemia hemorrágica viral	Varias secuencias siRNA. Interferencia no específica para la infección con el virus VHSV. Interferencia similar para la infección con un rabdovirus heterólogo	Ruiz <i>et al.</i> (2009)
Células de epiteloma de carpa	<i>Glicoproteína</i>	Transfección	Rabdovirus. Septicemia hemorrágica viral	Transfección con tres siRNAs diferentes específicos contra el gen de la glicoproteína viral, inhibe eficientemente la multiplicación viral en cultivos celulares infectados	Schyth <i>et al.</i> (2006)
Células de epiteloma de carpa	<i>Glicoproteína</i>	Transfección	Rabdovirus. Septicemia hemorrágica viral	Vector produce shRNAs. Apagamiento de la expresión del mRNA del gen G en forma secuencia específica en cultivos de células EPC. Supresión de la replicación viral específica dependiente de RNAi	Kim & Kim (2011)
Células de epiteloma EPC y células CHSE-214	<i>Glicoproteína</i>	Transfección	Rabdovirus. Septicemia hemorrágica viral	dsRNAs largos contra el gen G de VHSV suprimen efectivamente la expresión de su gen blanco, mientras que los dsRNAs controles no tienen efecto	Kim <i>et al.</i> (2012)
Juveniles de trucha arcoíris	<i>Glicoproteína</i>	Inyección intraperitoneal	Rabdovirus. Septicemia hemorrágica viral	Disminución de la mortalidad de los peces desafiados con el virus. La protección no dependió de los siRNA, más bien fue dependiente de respuesta interferón	Schyth <i>et al.</i> (2007)
Trucha arcoíris	<i>Glicoproteína</i>	Inyección intraperitoneal	Rabdovirus. Septicemia hemorrágica viral	Los siRNAs reducen la mortalidad en desafíos con VHSV. Al ser modificados, los siRNAs reducen la protección antiviral. Activación de sistema IFN.	Schyth <i>et al.</i> (2012)
Embriones de turbot	<i>Proteína de cápside</i>	Transfección	Iridovirus del besugo (red sea bream) Rabdovirus del hirame	Los miR entregados como pre-miRNA en células transfectadas, inhiben la replicación viral cuando las células fueron infectadas con el virus correspondiente. Sin embargo, el efecto inhibitorio no fue específico y se observó también en células transfectadas con un plásmido control. Activación de la vía IFN	Dang <i>et al.</i> (2008)

Continuación

Célula u organismo	Gen objetivo	Método de suministro	Virus	Resultado principal	Referencia
Células de <i>Haemulon plumieri</i>	Proteína de cápside	Transfección	Iridovirus del <i>Oplegnathus fasciatus</i>	Células transfectadas que producen RNAi contra la proteína de cápside viral, exhiben más resistencia al desafío con el virus que las células control	Zenke <i>et al.</i> (2010)
Células de riñón de carpa	RNA polimerasa dep. RNA y proteína de cápside	Transfección	Reovirus hemorrágico de carpa (GCR)	Los mRNAs del virus GCR fueron reducidos significativamente (sobre un 80%) en células CIK transfectadas con siRNAs e infectadas con GCR	Li <i>et al.</i> (2009)
Células de riñón de carpa (CIK)	RNA dep. RNA polimerasa (RdRp) Proteína de cápside (OCP)	Transfección	Reovirus hemorrágico de carpa (GCR)	El efecto citopático inducido por GCRV en células transfectadas fue retrasado y su intensidad reducida significativamente. El análisis cuantitativo por RT-PCR en tiempo real mostró que la expresión de los genes virales RdRp y OCP fueron reducidos en 89% y 73% respectivamente	Ma <i>et al.</i> (2011)
Células de ovarios de carpa	Proteína de envoltura 53R	Transfección	Virus de rana gyllo (RVG)	miRNA silenció la expresión de la proteína de envoltura viral y el ensamblaje de los viriones fue deficiente	Kim <i>et al.</i> (2010)

rones, para entender los mecanismos exactos de la regulación génica en este proceso (Kitagishi *et al.*, 2011).

Estrategias para suministrar dsRNA y sus limitaciones

La complejidad de suministrar el dsRNA a la célula objetivo, y mantener una cierta concentración circulando en el organismo, resulta una dificultad para aplicar *in vivo* esta interesante estrategia antiviral. En mamíferos, los siRNA son relativamente inestables en sangre en su forma nativa y rápidamente son eliminados del organismo mediante degradación por ribonucleasas, por acción renal o por ingreso no específico al sistema reticuloendotelial (Shim & Kwon, 2010). Los siRNA son macromoléculas aniónicas que no pueden ingresar fácilmente a una célula por difusión pasiva, es por ello que se hace relevante el buscar una forma de suministrarlos para permitir la circulación en el organismo y el ingreso a la célula, para así protegerlo de una posible hidrólisis enzimática, para evitar el reconocimiento del sistema inmune y finalmente para aumentar la farmacocinética del compuesto (Aagard & Rossi, 2007; Shim & Kwon, 2010).

Distintas estrategias se han probado para asegurar el ingreso del dsRNA a la célula. Una estrategia común es utilizar vehículos que protejan y faciliten el desplazamiento dentro del organismo, entre ellos los más utilizados son los liposomas, en particular los

catiónicos, que debido a su naturaleza anfipática son permeables en la membrana de fosfolípidos de la célula, posibilitando el ingreso del dsRNA a su interior. Algunos ejemplos son la anisamida o 4-metoxi benzamida y el polietilenglicol (Shim & Kwon, 2010). Otra modalidad de suministro es el uso de polímeros y péptidos, ya que los siRNA se unen fácilmente a polímeros catiónicos mediante interacciones electrostáticas. La polietilenimina que se obtiene a partir de monómeros de etilenimina es el polímero más utilizado, sin embargo tiene la desventaja de ser tóxico y no biodegradable (Shim & Kwon, 2010). Los polisacáridos catiónicos como el quitosano son de bajo costo y muy abundantes, posibilitando la formación de nanopartículas con el dsRNA a través de metodologías muy sencillas (Sarathi *et al.*, 2008; Shim & Kwon, 2010; Plant & LaPatra, 2011). El quitosano se produce a partir de la quitina, polisacárido presente en forma abundante en crustáceos, no es tóxico y es biodegradable. Además presenta mucoadhesión, lo que se traduce en que las nanopartículas se adhieren a la membrana mucosa, facilitando el suministro de lo que portan en el tiempo (Plant & LaPatra, 2011). También se utilizan los polipéptidos catiónicos, como el atelocolágeno, la polilisina y la protamina (Shim & Kwon, 2010) que se acomplejan con los siRNAs a través de interacciones electrostáticas.

Uno de los cuidados que se debe tener en cuenta, es que el uso de polímeros sintéticos para la entrega de

RNAi *in vivo* es tóxico dependiendo de la concentración al ser administrado en forma sistémica. Esa toxicidad puede ser aminorada por la conjugación con polímeros hidrofílicos biocompatibles como el polietilenglicol, o removiendo el exceso de polímeros catiónicos que no forman complejos. En general, se prefiere utilizar polímeros catiónicos naturales (quitosano, protamina) para la entrega de siRNA *in vivo* (Shim & Kwon, 2010).

Junto con aumentar la estabilidad y permeabilidad, se ha estudiado la mejor forma de suministrar el dsRNA al organismo objetivo. Entre los métodos utilizados como suministro, destacan la inyección directa (Posiri *et al.*, 2013), la transfección y el consumo de bacterias inactivas libres de RNasa III que sobreexpresan dsRNA, método probado exitosamente en nemátodos (*Caenorhabditis elegans*) (Timmons & Fire, 2001) y en camarón (*Penaeus monodon*) (Sarathi *et al.*, 2008).

Schyth *et al.* (2007) evaluaron el potencial antiviral de siRNA sintético inyectado de forma intraperitoneal en trucha arcoíris, desafiada con el virus de la septicemia hemorrágica viral. Compararon la efectividad antiviral al inyectarlo en su forma nativa y al inyectar un formulado con un liposoma policationico. El formulado siRNA-liposoma logró una disminución significativa de la mortalidad, mientras que la inyección con siRNA purificado no tuvo ningún efecto sobre la mortalidad de los peces en estudio (Schyth *et al.*, 2007). Esto demuestra la incapacidad del siRNA de llegar al interior de la célula objetivo, mientras que con la ayuda de un liposoma policationico logra entrar y permanecer al interior de la célula con el potencial de silenciar exitosamente los mRNA virales. Se debe considerar que la inyección intraperitoneal o intramuscular es un proceso costoso que requiere mucho trabajo, además el anestesiar al organismo genera un estrés que se puede traducir en una disminución en su tasa de crecimiento. Pero tal vez el mayor problema es que no se puede inyectar un pez de menos de 20 g de peso, a pesar de que es en ese estado cuando presenta los mayores problemas con enfermedades infecciosas (Plant & LaPatra, 2011).

Sarathi *et al.* (2008) aplicaron una técnica distinta, formularon un pellet de alimento recubierto con dsRNA para alimentar camarones adultos (*Penaeus monodon*) desafiados con el virus de la mancha blanca, una de las principales enfermedades de la industria del camarón. Se formularon dos tipos de pellet, uno de ellos recubierto directamente con la bacteria que sobreexpresó el dsRNA (Fig. 2), inactivada con formaldehído, y el segundo recubierto con nanopartículas elaboradas de quitosano-dsRNA. Ambos métodos presentaron resultados positivos, con valores de supervivencia mayores al control, sin embargo, fue el pellet con la bacteria

inactivada el que presentó mejores resultados de supervivencia (Sarathi *et al.*, 2008). Este método de suministro de dsRNA en alimento presenta ventajas interesantes; al no separar ni purificar el dsRNA de la célula productora, lo convierte en un método más económico. Además, el incorporarlo en el alimento en pellet, posibilita su aplicación en sistemas abiertos de cultivo como en balsas jaulas y otros sistemas masivos de cultivo.

Por otro lado, se debe considerar que la inmunestimulación preventiva se ha transformado en la principal herramienta profiláctica para el control de enfermedades en acuicultura, lo que hace que el correcto *delivery* de las moléculas de dsRNA que producen la inmunestimulación sea también un desafío. Los sistemas de nano- y micro-encapsulación son herramientas prometedoras para obtener vacunas eficientes contra enfermedades de peces. En este contexto, el uso de *nanocarriers* basados en liposomas ha sido pobremente explorado en los peces, aunque han sido exitosamente utilizados en otras especies. Ruyra *et al.* (2013) reportaron el uso de transportadores liposomales con una alta eficiencia de encapsulación y baja toxicidad, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (embriones y larvas de pez cebra). Ellos mostraron que un coctel liposomal de LPS-dsRNA es capaz de entrar en contacto con hepatocitos de pez cebra y macrófagos de trucha, siendo preferencialmente internalizado por endocitosis. Adicionalmente mostraron que el LPS-dsRNA liposomal induce una respuesta antiviral y proinflamatoria específica en ambos tipos de células. Este diseño de sistemas de entrega conteniendo inmunostimulantes que estimulen potentemente las vías inmunes innatas presentes en casi todos los peces, representa una estrategia completamente nueva y prometedora en el control y la prevención de la salud en sistemas acuícolas (Ruyra *et al.*, 2013).

dsRNA y sus efectos inmunomoduladores

En la actualidad no existen medidas terapéuticas eficaces para combatir las enfermedades virales de los peces de interés. A la fecha, las vacunas se consideran entre los métodos más efectivos que hay contra las enfermedades en acuicultura. La mayoría de éstas hoy en día utilizan adyuvantes, los cuales mejoran la respuesta humoral y celular (Ruyra *et al.*, 2013), siendo los dsRNA un candidato para potenciar este proceso. En este contexto, una gran cantidad de estudios han sido dirigidos a conocer el mecanismo de acción de los IFNs en peces. Los interferones (IFNs) son citoquinas que inducen un estado antiviral en las células y juegan un papel fundamental en la defensa frente a infecciones virales en vertebrados. A la fecha se han descrito tres tipos de IFN en vertebrados. Aquellos del tipo I y III

inician su señalización a través de distintos complejos receptores unidos a membrana y todos ellos utilizan la misma vía Jak/STAT para inducir un amplio rango de genes antivirales (Randall & Goodbourn, 2008). En mamíferos, el IFN de tipo I comprende predominantemente IFN- α e IFN- β , los cuales se relacionan con la actividad antiviral que involucra al sistema inmune innato; mientras que el IFN tipo II, que comprende IFN- γ , está asociado mayormente a una acción sobre el sistema inmune adaptativo durante la infección viral (Sun *et al.*, 2011).

Los IFNs de tipo I, IFN α/β en mamíferos, son inducidos en las células en respuesta a los productos intermediarios dsRNA de la replicación viral, generando así la primera barrera para frenar la replicación del virus (Goodbourn *et al.*, 2000; Lima *et al.*, 2013). Cuando IFNs de tipo I llegan al torrente circulatorio se unen al receptor de IFN α/β presente en las células y desencadenan a través de la vía de señalización JAK-STAT la transcripción de cientos de genes, algunos de los cuales codifican proteínas antivirales. Tal es el caso de la proteína quinasa R dependiente de dsRNA (PKR), la 2',5'-oligoadenilato sintetasa (OAS), la adenosina deaminasa específica de RNA (ADAR) y la proteína Mx (Boudinot *et al.*, 2001). Además del dsRNA viral, la transcripción de IFN tipo I puede ser inducida por otros ácidos nucleicos virales (ssRNA viral) y poly I: C (ácido poli-inosínico:policitidílico, dsRNA sintético), que son reconocidos por los *Toll Like Receptors* (TLRs) (Tabeta *et al.*, 2004). Los poly I:C son agonistas de los TLR, imitan las propiedades inmunoestimuladoras del dsRNA viral y se ha demostrado que poseen potencial para ser utilizados como adyuvantes de vacunas en experimentos previos (Thim *et al.*, 2012). Estos poly I:C producen inmunoestimulación a través de la vía de TLR3, localizado en las membranas endosomales y las vías de RIG-1 y MDA5, localizados en el citosol (Fig. 3). TLR3 está virtualmente presente en todos los peces y en particular, los teleósteos pueden responder a los dsRNA a través de las vías de TLR3, RIG-1 y MDA5 (Ruyra *et al.*, 2013).

Aunque se sabe poco sobre el sistema de señal del IFN en peces, la identificación de varios factores reguladores de IFN, receptores de IFN, TLRs, diferentes miembros de la vía JAK-STAT y proteínas inducidas por el IFN tipo I, sugiere que este mecanismo está muy bien conservado en peces y mamíferos. Se ha demostrado la actividad de moléculas tipo IFN frente a infecciones víricas en el suero de trucha arcoiris (De Kinkelin *et al.*, 1982). Graham & Secombes (1990) mostraron que los leucocitos de trucha arcoiris estimulados con mitógeno T-celular y en presencia de otras células, secretan una linfoquina con actividad

MAF (factor de actividad de macrófagos), y más tarde observaron que a su vez presentaba actividad IFN (Graham & Secombes, 1990). Por otro lado, Congleton & Sun (1996) demostraron que tras la estimulación *in vitro* con un rhabdovirus, los leucocitos de riñón de salmónidos, eran capaces de producir linfoquinas con actividad IFN.

Recientemente se han realizado esfuerzos para lograr la descripción de la respuesta antiviral, en particular, el rol del IFN en peces. Se ha sugerido que el IFN tipo I de pez cebra es homólogo al clúster génico de IFN tipo III de mamíferos, aunque esta hipótesis no ha sido probada y se encuentra en discusión (Zou *et al.*, 2007). Más recientemente se ha sugerido en peces no salmónidos, que IFN tipo I no es homólogo a ninguno de los tipos de IFN presente en mamíferos (Hamming *et al.*, 2011). En cuanto a peces salmónidos, se ha descubierto a nivel genómico un clúster génico que contiene 11 genes agrupados en subtipos IFNa1-3, IFNb1-4 e IFNc1-5 (Sun *et al.*, 2009), los cuales de acuerdo a su vía de señalización podrían ser ortólogos a IFN- α e IFN- β en humanos (Sun *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2014).

En cuanto a su funcionalidad, prácticamente no existen datos que soporten que los genes de IFN descubiertos en peces, posean efectos antivirales diferentes a los efectos clásicos que se han descrito en mamíferos. Estudios recientes que han probado la actividad *in vivo* de los distintos subtipos de IFN tipo I en salmón del Atlántico (IFNa, IFNb or IFNc), han mostrado que los tres inducen la expresión de genes antivirales (Chang *et al.*, 2014). IFNa e IFNc muestran una actividad antiviral similar, mientras que IFNb es menos activo (Svingerud *et al.*, 2012; Collet, 2014). IFNa es producido en la mayoría de las células e induce Mx, ISG15 y actividad antiviral contra IPNV. Por su parte, IFNc induce además la expresión de receptores para virus RNA (RIG-I, TLR3 y TLR7) y fuertemente, la expresión de Mx (Collet, 2014). Las proteínas Mx son una familia de GTPasas inducidas por interferón, que poseen una potente actividad antiviral, contra varios virus RNA en mamíferos y pollos, aunque los efectos antivirales de Mx en peces no se conocen mayormente. Sin embargo, en salmón del Atlántico se ha mostrado que existe una fuerte correlación entre la inhibición de IPNV y la expresión de la proteína Mx, en células de salmón estimuladas con IFN (Larsen *et al.*, 2004). Estos resultados sugieren que la administración de IFNc podría representar un nuevo método de protección del salmón atlántico contra las infecciones virales (Chang *et al.*, 2014).

En el caso del IFN de tipo II, IFN- γ , este es más similar entre peces y mamíferos, aunque hay algunas especies de peces que poseen un segundo tipo de IFN- γ

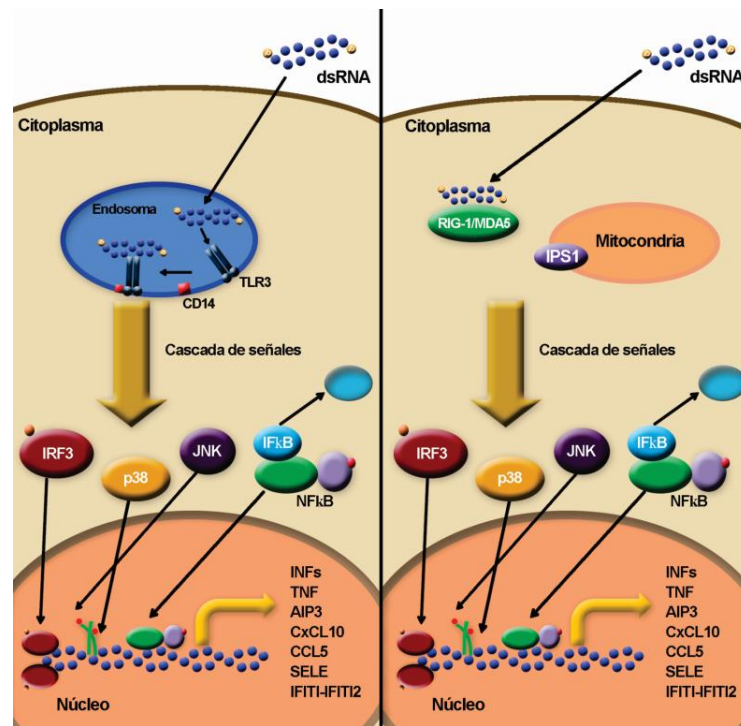


Figura 3. Activación de la vía de interferón a través de dsRNA, mediada por TLR3 (izquierda) o RIG-I/MDA5 (derecha). TLR3 reconoce los dsRNA en el lumen del endosoma (óvalo celeste), luego de lo cual dimeriza, se une a CD14 y activa una cascada de señales que lleva a su vez, a la activación de factores de transcripción. Los factores de transcripción activados se traslocan del citoplasma al núcleo, donde se unen a los promotores de sus genes blanco (IFNs, TNF, AIP3, CXCL10, CCL5, SELE, IFIT1-IFIT2) e inducen su transcripción. Por su parte, las helicasas RIG-1 y MDA5 (óvalo verde) localizadas en el citosol, reconocen el dsRNA y utilizan la proteína mitocondrial unida a membrana (IPS1, óvalo morado) como adaptador específico para activar una cascada de señales que activa a su vez, factores de transcripción que llevan a la inducción de la expresión de genes similares a los que se activan por la vía del TLR-3 (IFNs, TNF, AIP3, CXCL10, CCL5, SELE, IFIT1-IFIT2).

llamado γ rel (Sun *et al.*, 2011). En cuanto a las propiedades antivirales de IFN γ en peces, se sabe muy poco, aunque se sabe que induce el gen GBP (guanylate binding protein) en trucha (Sun *et al.*, 2011). Las GBPs pertenecen a la familia de las GTPasas inducidas en respuesta a IFN. De forma similar a lo que ocurre con Mx, las GBPs poseen una potente actividad antiviral contra un amplio rango de virus RNA en mamíferos, tales como el virus de la estomatitis vesicular y el virus influenza, entre otros (Nordmann *et al.*, 2012).

En cuanto a la respuesta inhibitoria no específica causada por el interferón (inducido por dsRNA) en la célula, inicialmente complicó la aplicación de RNAi en vertebrados, sin embargo, se ha encontrado que esto ocurre sólo cuando las concentraciones de RNAi aplicados son muy elevadas, o el largo del dsRNA exógeno es mayor a los 30 pares de bases (Schyth *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2013). Considerando los efectos positivos que pueden tener los dsRNA al estimular una potente vía de inmunidad innata, es necesario progresar

en los procesos que permitan implementar con mayor énfasis el concepto de inmunoestimulación preventiva, abriendo un enfoque completamente nuevo en la optimización de la salud de los peces.

Perspectivas futuras

La estrategia antiviral y/o de estimulación del sistema inmune innato utilizando dsRNA se proyecta como una alternativa real en sistemas de acuicultura que son afectados por infecciones virales. La efectividad del proceso y la secuencia-especificidad de la acción del RNAi, se muestran como sus principales ventajas. Sin embargo, la necesidad de que el dsRNA se encuentre presente al interior de la célula objetivo se convierte en la principal amenaza para este novedoso método antiviral. En consecuencia, se hace necesario investigar en tecnologías de suministro que aseguren el ingreso del dsRNA al organismo y luego a la célula objetivo. Al mismo tiempo se requiere identificar formulados que sean estables para resistir almacenaje y uso industrial a gran escala.

CONCLUSIONES

El uso de los dsRNA presenta un interesante potencial para la estimulación del sistema inmune innato y para el control de enfermedades infecciosas causadas por virus en sistemas de acuicultura. Algunos estudios han mostrado los efectos inmunomoduladores que podrían tener los dsRNA utilizados en vacunas para inducir la estimulación del sistema inmune innato. De igual forma, algunos estudios han demostrado efectividad sobre virus que causan importantes problemas en el cultivo de crustáceos y peces, entre ellos, el virus de la mancha blanca, virus hemorrágico de la carpa y el virus de la septicemia hemorrágica. Para obtener mejores resultados, es necesario profundizar en el estudio del método y formulación para suministrar eficientemente el dsRNA o los RNAi, considerando variables como la estabilidad, toxicidad, ausencia de efectos no específicos, costo, y la factibilidad de usarlo en sistemas masivos de cultivo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Erick Guíñez y Sebastián Ramírez por su apoyo en el diseño y construcción de figuras. Katherine García y Jaime Romero agradecen el aporte de Fondecyt Proyecto Postdoctorado 3120081 y Fondef D10I1056, respectivamente.

REFERENCIAS

- Aagaard, L. & J.J. Rossi. 2007. RNAi therapeutics: principles, prospects, and challenges. *Advan. Drug Delivery Rev.*, 59(2): 75-86.
- Aigner, A. 2006. Gene silencing through RNA interference (RNAi) *in vivo*: strategies based on the direct application of siRNAs. *J. Biotechnol.*, 124(1): 12-25.
- Almeida, R. & R.C. Allshire. 2005. RNA silencing and genome regulation. *Trends Cell Biol.*, 15(5): 251-258.
- Bohle, H., N. Lorenzen & B.D. Schyth. 2011. Species specific inhibition of viral replication using dicer substrate siRNAs (DsiRNAs) targeting the viral nucleoprotein of the fish pathogenic rhabdovirus viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Antiv. Res.*, 90: 187-194.
- Boonanuntanasarn, S., G. Yoshizaki & T. Takeuchi. 2003. Specific gene silencing using small interfering RNAs in fish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 310(4): 1089-1095.
- Boudinot, P., S. Salhi, M. Blanco & A. Benmansour. 2001. Viral haemorrhagic septicaemia virus induces vig-2, a new interferon-responsive gene in rainbow trout. *Fish Shell. Immunol.*, 11(5): 383-397.
- Chang, C.J., C. Robertsen, B. Sun & B. Robertsen. 2014. Protection of Atlantic salmon against virus infection by intramuscular injection of IFN α expression plasmid. *Vaccine*, 32(36): 4695-4702.
- Congleton, J. & B. Sun. 1996. Interferon-like activity produced by anterior kidney leucocytes of rainbow trout stimulated *in vitro* by infectious hematopoietic necrosis virus or Poly:C. *Dis. Aquat. Org.*, 25: 185-195.
- Collet, B. 2014. Innate immune responses of salmonid fish to viral infections. *Dev. Comp. Immunol.*, 43: 160-173.
- Dang, L.T, H. Kondo, T. Aoki & I. Hirono. 2008. Engineered virus-encoded pre-microRNA (pre-miRNA) induces sequence-specific antiviral response in addition to nonspecific immunity in a fish cell line: convergence of RNAi-related pathways and IFN-related pathways in antiviral response. *Antiv. Res.*, 80(3): 316-323.
- De Kinkelin, P., M. Dorson & A.M. Hattenberger-Baudouy. 1982. Interferon synthesis on trout and carp after viral infection. *Dev. Comp. Immunol. Suppl.*, 2: 167-174.
- Donze, O. & D. Picard. 2002. RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.*, 30: e46.
- Duxbury, M.S. & E.E. Whang. 2004. RNA interference: a practical approach. *J. Surg. Res.*, 117: 339-344.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. [http://www.fao.org/docrep/016/i2727s/i2727s.pdf]. Revisado: 28 septiembre 2014.
- García, K., S. Ramírez-Araya, Á. Díaz, S. Reyes-Cerpa, R.T. Espejo, G. Higuera & J. Romero. 2015. Inactivated *E. coli* transformed with plasmids that produce dsRNA against infectious salmon anemia virus hemagglutinin show antiviral activity when added to infected ASK cells. *Front. Microbiol.*, 6: 300.
- Gavrilov, K. & W.M. Saltzman. 2012. Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies. *Yale J. Biol. Medic.*, 85(2): 187-200.
- Goodbourn, S., L. Didcock & R.E. Randall. 2000. Interferons: cell signaling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.*, 81(Pt10): 2341-2364.
- Gotesman, M., J. Kattlun, S.M. Bergmann & M. El-Matbouli. 2013. CyHV-3: the third cyprinid herpesvirus. *Dis. Aquat. Organ.*, 105(2): 163-174.
- Graham, S. & C.J Secombes. 1990. Cellular requirements for lymphokine secretion by rainbow trout *Salmo gairdneri* leucocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, 14: 59-68.

- Guy, D.R., S.C. Bishop, S. Brotherstone, A. Hamilton, R.J. Roberts, B.J. McAndrew & J.A. Woolliams. 2006. Analysis of the incidence of infectious pancreatic necrosis mortality in pedigreed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., populations. *J. Fish Dis.*, 29(11): 637-647.
- Hamming, O.J., G. Lutfalla, J.P. Levraud & R. Hartmann. 2011. Crystal structure of zebrafish interferons I and II reveals conservation of type I interferon structure in vertebrates. *J. Virol.*, 85: 8181-8187.
- Hedrick, R.P., O. Gilad, S. Yun, J.V. Spangenberg, G.D. Marty, R.W. Nordhausen, M.J. Kebus, H. Bercovier & A. Eldar. 2000. A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. *J. Aquat. Anim. Health*, 12(1): 44-57.
- Ilouze, M., A. Dishon & M. Kotler. 2006. Characterization of a novel virus causing a lethal disease in carp and koi. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, 70(1): 147-156.
- Kim, M.S. & K.H. Kim. 2011. Inhibition of viral hemorrhagic septicemia virus replication using a short hairpin RNA targeting the G. Gene. *Arch. Virol.*, 156(3): 457-464.
- Kim, Y.S., F. Ke, X.Y. Lei, R. Zhu & Q.Y. Zhang. 2010. Viral envelope protein 53R gene highly specific silencing and iridovirus resistance in fish cells by AmiRNA. *PLoS One*, 23:5(4): e10308.
- Kim, D.H., M.A. Behlke, S.D. Rose, M.I.S. Chang, S. Choi & J.J. Rossi. 2005. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat. Biotechnol.*, 23(2): 222-226.
- Kim, M.S., B.Y. Jee, M.Y. Cho, J.W. Kim, H.D. Jeong & K.H. Kim. 2012. Fugu double U6 promoter-driven long double-stranded RNA inhibits proliferation of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in fish cell lines. *Arch. Virol.*, 157(6): 1029-1038.
- Kitagishi, Y., N. Okumura, H. Yoshida, C. Tateishi, Y. Nishimura & S. Matsuda. 2011. Dicer functions in aquatic species. *J. Amino. Acids*, Article ID: 782187.
- LaFauce, K & L. Owens. 2012. RNA interference with special reference to combating viruses of crustacean. *Indian J. Virol.*, 23(2): 226-243.
- Larsen, R., T.P. Røkenes & B. Robertsen. 2004. Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by Atlantic salmon mx1 protein. *J. Virol.*, 78(15): 7938-7944.
- Li, B., Y.D. Fan, Y.Q. Li, J. Xu, Y. Zhou & L.B. Zeng. 2009. Highly efficient inhibition on replication of grass carp reovirus mediated by chemically synthesized small interfering RNAs. *Bing Du Xue Bao.*, 25(5): 388-394.
- Lightner, D.V. (ed.). 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, 304 pp.
- Lima, P.C., J.O. Harris & M. Cook. 2013. Exploring RNAi as a therapeutic strategy for controlling disease in aquaculture. *Fish Shell. Immunol.*, 34(3): 729-743.
- Ma, J., W. Wang, L. Zeng, Y. Fan, J. Xu & Y. Zhou. 2011. Inhibition of the replication of Grass Carp Reovirus in CIK cells with plasmid-transcribed shRNAs. *J. Virol. Meth.*, 175: 182e7.
- Mardones, F.O., A.M. Perez, P. Valdes-Donoso & T.E. Carpenter. 2011. Farm-level reproduction number during an epidemic of infectious salmon anemia virus in southern Chile in 2007-2009. *Prev. Vet. Med.*, 102(3): 175-184.
- Nylund, A., H. Plarre, M. Karlsen, F. Fridell, K.F. Ottem, A. Bratland & P.A.S. Saether. 2007. Transmission of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in farmed populations of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Arch. Virol.*, 152(1): 151-179.
- Nordmann, A., L. Wixler, Y. Boergeling, V. Wixler & S. Ludwig. 2012. A new splice variant of the human guanylate-binding protein 3 mediates anti-influenza activity through inhibition of viral transcription and replication. *FASEB J.*, 26: 1290-1300.
- Plant, K.P. & S.E. LaPatra. 2011. Advances in fish vaccine delivery. *Dev. Comp. Immunol.*, 35(12): 1256-1262.
- Posiri, P., C. Ongvarrasopone & S. Panyim. 2013. A simple one-step method for producing dsRNA from *E. coli* to inhibit shrimp virus replication. *J. Virol. Meth.*, 188: 64-69.
- Provost, P., D. Dishart, J. Doucet, D. Friendewey, B. Samuelsson & O. Radmark. 2002. Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *EMBO J.*, 1: 21(21): 5864-5874.
- Randall, R. & S. Goodbourn. 2008. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.*, 89(Pt1): 1-47.
- Ruiz, S., B.D. Schyth, P. Encinas, C. Tafalla, A. Estepa, N. Lorenzen & J.M. Coll. 2009. New tools to study RNA interference to fish viruses: fish cell lines permanently expressing siRNAs targeting the viral polymerase of viral hemorrhagic septicemia virus. *Antiv. Res.*, 82(3): 148-156.
- Ruyra, A., M. Cano-Sarabia, S.A. Mackensie, D. Mspoch & N. Roher. 2013. A novel liposome-based nanocarrier loaded with an LPS-dsRNA cocktail for fish innate immune system stimulation. *PLoS One*, 18:8(10): e76338.
- Sarathi, M., M.C. Simon, C. Venkatesan & A.S. Hameed. 2008. Oral administration of bacterially expressed VP28dsRNA to protect *Penaeus monodon* from white spot syndrome virus. *Mar. Biotechnol.*, 10(3): 242-249.

- Sarathi, M., M.C. Simon, C. Venkatesan, J. Thomas, M. Ravi, N. Madan, S. Thiyagarajan & A.S. Sahul-Hameed. 2010. 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.*, 33(7): 603-607.
- Schyth, B.D., N. Lorenzen & F.S. Pedersen. 2006. Antiviral activity of small interfering RNAs: specificity testing using heterologous virus reveals interferon-related effects overlooked by conventional mismatch controls. *Virology*, 25: 349(1): 134-141.
- Schyth, B.D., N. Lorenzen & F.S. Pedersen. 2007. A high throughput *in vivo* model for testing delivery and antiviral effects of siRNAs in vertebrates. *Mol. Ther.*, 15(7): 1366-1372.
- Schyth, B.D., J.B. Bramsen, M.M. Pakula, S. Larashati, J. Kjems, J. Wengel & N. Lorenzen. 2012. *In vivo* screening of modified siRNAs for non-specific antiviral effect in a small fish model: number and localization in the strands are important. *Nucleic Acids Res.*, 40(10): 4653-4665.
- Shim, M.S. & Y.J. Kwon. 2010. Efficient and targeted delivery of siRNA *in vivo*. *FEBS J.*, 277(23): 4814-4827.
- Shuey, D.J., D.E. McCallus & T. Giordano. 2002. RNAi: gene-silencing in therapeutic intervention. *Drug Discov. Today*, 7(20): 1040-1046.
- Solis, C.F., J. Santi-Rocca, D. Perdomo, C. Weber & N. Guillén. 2009. Use of bacterially expressed dsRNA to downregulate *Entamoeba histolytica* gene expression. *PLoS One*, 4(12): e8424.
- Su, J., Z. Zhu, Y. Wang, J. Zou, N. Wang & S. Jang. 2009. Grass carp reovirus activates RNAi pathway in rare minnow, *Gobiocypris rarus*. *Aquaculture*, 289: 1e5.
- Sui, G., C. Soohoo, E.B. Affar, F. Gay, Y. Shi, W.C. Forrester & Y. Shi. 2002. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99: 5515-5520.
- Sun, B., B. Robertsen, Z. Wang & B. Liu. 2009. Identification of an Atlantic salmon IFN multigene cluster encoding three IFN subtypes with very different expression properties. *Dev. Comp. Immunol.*, 33(4): 547-558.
- Sun, B., I. Skjæveland, T. Svingerud, J. Zou, J. Jørgensen & B. Robertsen. 2011. Antiviral activity of salmonid gamma interferon against infectious pancreatic necrosis virus and salmonid alphavirus and its dependency on type I interferon. *J. Virol.*, 85(17): 9188-9198.
- Svingerud, T., T. Solstad, B. Sun, M.L. Nyrud, Ø. Kileng, L. Greiner-Tollersrud & B. Robertsen. 2012. Atlantic salmon type I IFN subtypes show differences in antiviral activity and cell-dependent expression: evidence for high IFN β /IFN γ -producing cells in fish lymphoid tissues. *J. Immunol.*, 15: 189(12): 5912-5923.
- Tabeta, K., P. Georgel, E. Janssen, X. Du, K. Hoebe, K. Crozak, S. Mudd, L. Shamel, S. Sovath, J. Goode, L. Alexoupoulou, R.A. Flavell & B. Beutler. 2004. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101(10): 3516-3521.
- Tenllado, F., B. Martínez-García, M. Vargas & J.R. Díaz-Ruiz. 2003. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. *BMC Biotechnol.*, 3(1): 3.
- Terpe, K. 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72(2): 211-222.
- Thim, H., D. Iliev, K. Christie, S. Villoing, M. McLoughlin & S. Jørgensen. 2014. Immunoprotective activity of a Salmonid Alphavirus Vaccine: comparison of the immune responses induced by inactivated whole virus antigen formulations based on CpG class B oligonucleotides and poly I:C alone or combined with an oil adjuvant. *Vaccine*, 30(32): 4828-4834.
- Thoulouze, M.-I., E. Bouguyon, C. Carpentier & M. Brémont. 2004. Essential role of the NV protein of *Novirhabdovirus* for pathogenicity in rainbow trout. *J. Virol.*, 78(8): 4098-4107.
- Timmons, L. & A. Fire. 1998. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, 395: 854.
- Timmons, L. & A. Fire. 2001. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, 263(1): 103-112.
- Xie, J., L. Lü, M. Deng, S. Weng, J. Zhu, Y. Wu, L. Gan, S.M. Chan & J. He. 2005. Inhibition of reporter gene and Iridovirus-Tiger Frog Virus in fish cell by RNA interference. *Virology*, 20: 338(1): 43-52.
- Yin, G., Z. Sun, N. Liu, L. Zhang, Y. Song, C. Zhu & F. Wen. 2009. Production of double-stranded RNA for interference with TMV infection utilizing a bacterial prokaryotic expression system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84(2): 323-333.
- Zamore, P.D., T. Tuschl, P.A. Sharp & D.P. Bartel. 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell.*, 101: 25-33.
- Zenke, K., Y.K. Nam & K.H. Kim. 2010. Development of siRNA expression vector utilizing rock bream beta-actin promoter: a potential therapeutic tool against viral infection in fish. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85(3): 679-690.

Zou, J., C. Tafalla, J. Truckle & C.J. Secombes. 2007. Identification of a second group of type I IFNs in fish sheds light on IFN evolution in vertebrates. *J. Immunol.*, 179: 3859-3871.

Received: 29 September 2014; Accepted: 14 January 2015