



ALLIANCE™

<https://www.globalseafood.org>Health &
Welfare

Silenciar una proteína clave puede reducir significativamente la transmisión de EHP en camarones cultivados

1 April 2024

By Dr. Chanadda Kasamechotchung

Los resultados del estudio mostraron que la proteína EhPTP2 es fundamental en el ciclo de vida de EHP y que apuntar al ARNm de EHP en las células huésped puede ser eficaz

El microsporidio *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) infecta el hepatopáncreas (HP) y el intestino de los camarones peneidos, incluido el camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*) y el camarón tigre negro (*P. monodon*) de cultivo. Una infección grave en el camarón provoca un retraso en el crecimiento y una consiguiente reducción de la productividad.

Los microsporidios son parásitos intracelulares obligados con una espora infecciosa característica que contiene un orgánulo de invasión llamado tubo polar. Una pared de esporas de doble capa, que consta de una capa externa (exospora) y una capa interna rica en quitina (endospora), permite que la espora

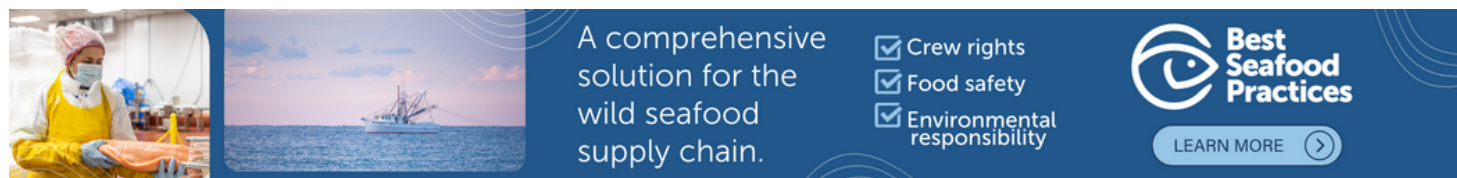


Investigaciones recientes han demostrado que una proteína en el tubo polar de las esporas de EHP, EhPTP2, desempeña un papel crucial en el ciclo de vida de esta importante enfermedad del camarón, y que el ARNds dirigido al ARNm de EHP puede llegar eficazmente al parásito que se desarrolla en las células huésped. Por lo tanto, silenciar esta proteína clave puede reducir significativamente la transmisión de EHP en camarones cultivados. Este enfoque es un modelo para futuras investigaciones para identificar genes críticos para la supervivencia y propagación de EHP como objetivos potenciales para medidas preventivas y terapéuticas en camarones. Foto de Darryl Jory.

resista **ambientes externos hostiles** (<https://doi.org/10.1128/9781555818227.ch2>).

Tras la inducción o en condiciones oportunas, la espora extruye su tubo polar para perforar una célula huésped e iniciar un ciclo de vida intracelular en un proceso llamado germinación. El tubo polar sirve como conducto a través del cual el esporoplasma (contenido de una espora de ciertos microorganismos parásitos, que se inyecta e infecta una célula huésped) se transfiere a la célula huésped. Se ha informado que muchos estímulos desencadenan la germinación de esporas, según lo revisado por **Weiss y sus colegas** (<https://doi.org/10.1002/9781118395264.ch10>). El tubo polar está formado por diferentes proteínas del tubo polar y, hasta la fecha, se han identificado siete proteínas del tubo polar, denominadas **PTP1 a PTP7** (<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737062>).

Se ha demostrado que la inactivación por calor de las esporas de EHP previene la extrusión de esporas, lo que en consecuencia inhibe la infectividad de las esporas, lo que sugiere que el proceso de extrusión de esporas es un requisito previo para la **infección por EHP en camarones** (<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736178>). El ARN de interferencia (ARNi) es una técnica que se ha aplicado en varios estudios de virus del camarón tanto en entornos preventivos como terapéuticos. Estudios anteriores respaldan la hipótesis de que el silenciamiento de las PTP mediante ARNi reduciría la infección por microsporidios.



(<https://bspcertification.org/>).

En este estudio, planteamos la hipótesis de que la proteína del tubo polar EhPTP2 está asociada con la germinación de esporas. Por lo tanto, predijimos que el silenciamiento de EhPTP2 inhibiría la replicación de EHP, reduciría el número de copias de EHP y reduciría la transmisión de EHP. Esta investigación proporciona una plataforma para un mayor desarrollo de posibles tratamientos terapéuticos o preventivos para la infección por EHP basados en la supresión de EhPTP2.

Este artículo – resumido de la **publicación original** (<https://doi.org/10.1038/s41598-024-55400-2>). (Yuanlae, S. et al. 2024. Shrimp injection with dsRNA targeting the microsporidian EHP polar tube protein reduces internal and external parasite amplification. *Sci Rep* 14, 4830 (2024) – informa sobre un estudio para determinar si el silenciamiento de EhPTP2 inhibiría la replicación de EHP, reduciría el número de copias de EHP y reduciría la transmisión de EHP.

Configuración del estudio

Para identificar las proteínas implicadas en el proceso de germinación de las esporas, se aislaron esporas de EHP del hepatopáncreas (HP) de *P. vannamei* infectado con EHP. Las esporas se incubaron y germinaron, y se seleccionaron para el análisis las proteínas de esporas de EHP más abundantes.

Nuestra hipótesis es que la presencia de una de estas proteínas del tubo polar, EhPTP2, podría ser necesaria para una extrusión exitosa de esporas de EHP. Para probar esta hipótesis, inyectamos ARN bicatenario (ARNds) específico de EhPTP2 en camarones sanos y descubrimos que disminuía significativamente el número de copias de EHP en camarones infectados.

Para obtener información detallada sobre el diseño experimental y los procedimientos utilizados, consulte el artículo original.

Digestibilidad aparente de seis nuevas fuentes de proteína en dietas de camarón blanco del Pacífico



En una prueba de digestibilidad, nuevas fuentes de proteínas como proteínas unicelulares mostraron el mayor potencial para dietas de camarones blancos del Pacífico.



Global Seafood Alliance

Resultados y discusión

Nuestros resultados mostraron que dos métodos: ensayo de inmunofluorescencia (IFA; una técnica importante comúnmente utilizada en inmunología o biología molecular para detectar la presencia y distribución de proteínas específicas) e inmunohistoquímica (IHC; una forma de inmunotinción para identificar selectivamente proteínas en células y tejidos) – que detectan la expresión de la proteína EhPTP2 se pueden utilizar para monitorear la germinación y localización de las esporas de EHP en camarones infectados.

La detección de esporas de EHP mediante microscopía óptica es un desafío debido a la necesidad de una lente de gran aumento (100x). Dirigirse a genes o proteínas específicos asociados con EHP puede ofrecer una detección más sensible y específica. La proteína 2 del tubo polar de EHP (EhPTP2) sirve como un objetivo valioso para la detección debido a su participación en el proceso de extrusión del tubo polar, que constituye un paso crítico en el ciclo de vida del parásito.

Nuestra investigación indica que se puede emplear la proteína EhPTP2 para detectar esporas de EHP extruidas en muestras de esporas aisladas. Este hallazgo sugiere que la IFA podría ser beneficiosa para monitorear la germinación de esporas de EHP.

Además, más allá de la detección de esporas vivas, EhPTP2 también se puede utilizar como objetivo para detectar infección por EHP en secciones histológicas de camarón mediante IHC (Fig. 1). Nuestro hallazgo respalda el uso de la detección de EhPTP2 como método de diagnóstico para la infección por EHP, lo que es consistente con informes anteriores de detección de EhPTP2 utilizando otras tecnologías.

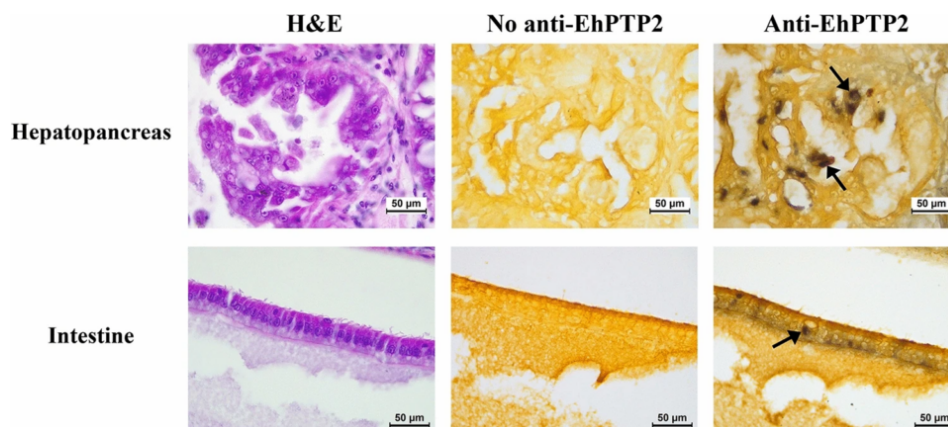


Fig. 1: Proteína EhPTP2 del tubo polar de EHP detectada en el hepatopáncreas y el intestino mediante inmunohistoquímica. Se analizaron fotomicrografías de 3 secciones consecutivas de tejido de camarón de una muestra recolectada después de 7 días de convivencia mediante tinción con hematoxilina y eosina (H&E) (columna izquierda), inmunohistoquímica de control negativo (columna central) e inmunohistoquímica para detectar EhPTP2 utilizando un anticuerpo anti-EhPTP2 (columna derecha). Los precipitados de color marrón oscuro indican señales positivas para EhPTP2 en las células hepatopancreáticas y las células epiteliales del intestino (flechas negras). Adaptado del original.

Los resultados también mostraron que la germinación en el intestino puede no conducir a una infección exitosa. Además de germinar en el hepatopáncreas (HP) como en informes anteriores, se aisló una pequeña cantidad de esporas germinadas del intestino y se detectaron mediante inmunohistoquímica de EhPTP2. A lo largo del tracto digestivo de los camarones, hay un tamiz gástrico (GS) que sirve como filtro de exclusión de tamaño para partículas de aproximadamente 0,2 a 0,7 micrómetros de diámetro.

Las partículas más grandes se desvían al intestino en lugar del HP. Dado que el tamaño promedio de las esporas ovaladas de EHP es de aproximadamente 1 micrón de largo, es posible que las esporas germinadas detectadas en el intestino se derivaran de aquellas cuyo tamaño fue excluido del HP por el GS. Si bien se detectaron esporas germinadas y señales positivas de EhPTP2 mediante inmunohistoquímica en el intestino, la evidencia sigue siendo insuficiente para concluir que el intestino es otro sitio de proliferación de EHP. En cambio, especulamos que la presencia de esporas germinadas en el resultado histológico fue el remanente de contaminación fecal en lugar de una infección activa.

Con respecto a las aplicaciones terapéuticas y preventivas de la supresión de EhPTP2, dado que EhPTP2 está asociado con la extrusión de tubos polares, se sugiere que la supresión del ácido ribonucleico mensajero de EhPTP2 (ARNm; involucrado en la síntesis de proteínas en las células) inhibiría el proceso de extrusión y daría como resultado una reducción de la infección por EHP. De hecho, este fue el caso cuando se inyectó por vía intramuscular ácido ribonucleico bicatenario (ARNds; asociado con la mayoría de las infecciones virales, constituye el genoma viral en el caso de los virus ARNds o se genera en las células huésped durante la replicación viral) específico de EhPTP2 en camarones infectados con EHP (Fig. 2).

Fig. 2: La supresión de la expresión del ARNm de EhPTP2 en camarones infectados con EHP afecta negativamente la tasa de transmisión horizontal. (A) Un diagrama que representa el diseño experimental para probar cómo el dsRNA de EhPTP2 afectó la transmisión horizontal de EHP a camarones sin tratamiento previo. A los camarones infectados con EHP se les inyectaron tres dosis de dsRNA, en tres intervalos de 7 días, y luego los camarones vírgenes cohabitaron durante 14 días. (B, panel superior) La detección por RT-PCR de la expresión de la transcripción de EhPTP2 en camarones no infectados después de la cohabitación y la detección por PCR de la acumulación del gen SWP también indicaron una baja tasa de replicación de EHP en camarones no infectados cuando cohabitaban con camarones infectados con EHP a los que previamente se les había inyectado EhPTP2dsRNA (inferior). M = marcador de ADN, - ve = control negativo. Adaptado del original.

La inhibición de la infección cuando la técnica de ARNi se aplica de forma preventiva no es infrecuente cuando se eliminan genes virulentos clave en camarones ingenuos antes de la **exposición al patógeno** (<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.05.007>). Por ejemplo, en un estanque de cultivo se observó una gran variación de los niveles de infección por EHP en la población. El 25 por ciento de los camarones a los que se les inyectó dsRNA y mostraron infección por EHP podrían ser aquellos infectados con altos niveles de EHP. Si se puede aplicar la cuarta dosis de dsRNA-EhPTP2, podría reducir la infección. Lo que fue prometedor, en este estudio, es el hecho de que la administración de ARNs específico de EhPTP2 podría utilizarse terapéuticamente una vez que la infección ya se había establecido en dos aspectos: (1) reducir las cargas de EHP en camarones infectados y (2) reducir una mayor propagación de EHP en estanques de camarones. Sólo unos pocos informes han documentado aplicaciones terapéuticas exitosas en **camarones infectados con patógenos** (<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.09.009>).

Teniendo en cuenta que la infección por EHP es crónica y que el impacto negativo sobre el crecimiento no es perceptible hasta que el número de copias de EHP alcanza un umbral crítico de 10^3 copias por nanogramo de ADN total del hepatopáncreas, los datos disponibles sugieren que la combinación de vigilancia rutinaria y aplicación terapéutica de ARNs contra la proteína EhPTP2 del tubo polar de EHP puede tener potencial para controlar el EHP.

Perspectivas

Los resultados de este estudio revelaron que EhPTP2 desempeña un papel crucial en el ciclo de vida de EHP y que el dsRNA dirigido al ARNm de EHP puede llegar eficazmente al parásito que se desarrolla en las células huésped. Este enfoque es un modelo para futuras investigaciones para identificar genes críticos para la supervivencia y propagación de EHP como objetivos potenciales para medidas preventivas y terapéuticas en camarones cultivados.

Author



DR. CHANADDA KASAMECHOTCHUNG

Corresponding author

Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Rajamangala University of Technology Tawan-ok, Chonburi, 20110, Thailand

chanadda_ka@rmutto.ac.th (mailto:chanadda_ka@rmutto.ac.th)

