

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



IDENTIFICACIÓN DE GENES VIRALES (VIRUS DE LA MANCHA BLANCA) IMPLICADOS EN LA MORTANDAD DE CAMARÓN BLANCO

PRESENTA

Álvaro Hernán Hernández Montiel

Ensenada, Baja California, México.

IDENTIFICACIÓN DE GENES VIRALES (VIRUS DE LA
MANCHA BLANCA) IMPLICADOS EN LA MORTANDAD DE
CAMARÓN BLANCO

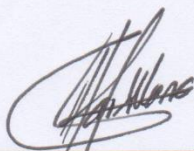
TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Licenciado en Biotecnología en Acuicultura

PRESENTA:

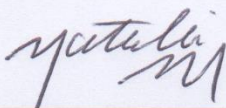
Alvaro Hernán Hernández Montiel

APROBADO POR:



Dra. Ivone Giffard Mena

Directora de tesis



Dra. Natalie Millán Aguiñaga

Sinodal



Dr. Dante Magdaleno Moncayo

Sinodal

Ensenada, B.C México. Agosto de 2018.

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de la existencia humana, han existido personas naturalmente interesadas en comprender como y porque ocurren cambios en todo lo que nos rodea, mismas que han logrado una capacidad inherente en la transmisión de los conocimientos adquiridos, con base en sus valores y el método científico.

Lo que me lleva a agradecer al cuerpo académico de la Universidad Autónoma de Baja California y Facultad de Ciencias Marinas, por inculcarme esas bases.

En especial agradezco a la Dra. Ivone Giffard Mena, por su confianza al permitirme trabajar con usted, por ser una benévola guía y apoyar mis ideas. Un ejemplo que seguir, que me ayudo a entender y apreciar el generoso oficio de la docencia. Sin importar su tan ilustre carrera, siempre tuvo tiempo para despejar mis dudas.

A la Dra. Natalie Millán Aguiñaga y al Dr. Dante Magdaleno Moncayo por el asesoramiento y apoyo durante el proceso de mi trabajo.

Gracias Al Dr. Manfred Weidmann y sus colaboradores Jose Gustavo Ramírez Paredes y Michael Bekaer de la Universidad de Stirling, por su apoyo en la parte de Bioinformática.

Gracias al grupo de trabajo del LPEA y ecología molecular, así como a mis compañeros que me apoyaron en cada etapa de este trabajo.

Gracias a todos por poner a mi disposición el valor incalculable de sus conocimientos y apoyo moral, que me impulsaron para seguir adelante.

DEDICATORIA

A mi madre y mi padre por demostrarme que siempre cuento con ellos.

A mi familia y amigos que me apoyaron en todo momento y creyeron en mis capacidades.

A Karla que sin importar por que momento pasaba, lograbas llenarme de confianza, con una sonrisa grande como la tuya y la de nuestra sirena, las amo.

RESUMEN

Estudios realizados con el virus de la mancha blanca (WSSV), indican la presencia de deleciones e inserciones en su genoma que se podrían relacionar con la virulencia ocasionada al camarón entre diferentes aislados. La alta tasa de mutación viral en conjunto con las múltiples vías de infección, podrían ser la causa de la prevalencia y elevados índices de mortalidad en los hospederos. Para identificar los genes potencialmente causantes de incrementar la virulencia del WSSV, se evaluó la patogenicidad en camarón blanco *Peneaus vannamei* de tres aislados de diferente origen geográfico (uno de Sonora, '2008' y dos de Sinaloa, 'Ciad' y 'Angostura'). Se evaluó el tiempo y porcentaje de mortandad post-infección y se cuantificó y comparó la carga viral por PCR en tiempo real (Q-PCR) entre los diferentes tratamientos. Posteriormente se realizó una secuenciación masiva de tejido de camarón infectado con los diferentes aislados para hacer una comparación genómica entre ellos, así como con los genomas del WSSV publicados en la base de datos genéticos del GenBank. Se detectaron diferencias significativas en el tiempo de mortandad del camarón entre los tres aislados probados, siendo más virulento uno de los aislados de Sinaloa el cual además presentó mayor carga viral. Existe una zona de deleción en este genoma que comprende 15 genes entre los que se encuentran tres proteínas de envoltura; vp41A, vp52A y vp41B, el resto codifican para proteínas cuya función actualmente es desconocida. Se discuten las principales implicaciones y posibles ventajas de estos mecanismos co-evolutivos.

Palabras clave: Genómica del virus de la mancha blanca, virulencia, aislados virales, proteínas de envoltura, secuenciación masiva.

ABSTRACT

Studies conducted with the White Spot Syndrome Virus (WSSV), indicate the presence of deletions and insertions in its genome that could be related to the virulence caused to shrimp between different isolates. The high viral mutation rate together with the multiple infection routes could be the cause of the prevalence and high mortality rates in the host. To identify the potentially causative genes of increasing the virulence of the WSSV, the pathogenicity of white shrimp *Peneaus vannamei* from three isolates of different geographical origin was evaluated (one from Sonora '2008' and two from Sinaloa, 'CIAD' and 'Angostura'). Mortality and mortality time post-infection time were taken, and the viral load was quantified and compared by real-time PCR (Q-PCR) between treatments. Subsequently, a massive sequencing of shrimp tissue infected with the different isolates was performed to make a genomic comparison between them as well as with the genomes of the WSSV already published in the GenBank genetic database. Significant differences were detected in the shrimp mortality time between the three tested isolates, the most virulent being from Sinaloa, which also had a higher viral load. There is a deletion zone in this genome that comprises 15 genes, among them three envelope proteins; vp41A, vp52A and vp41B, the rest encode for proteins whose function is currently unknown. The main implications and possible advantages of these co-evolutionary mechanisms are discussed.

Key words: Genomics of white spot virus, virulence, viral isolates, envelope proteins, mass sequencing.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	7
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	7
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	7
3. HIPÓTESIS	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
4.1 Preparación de inóculos virales (WSSV).....	9
4.2 Activación de inoculos.....	10
4.3 Comparación de virulencia entre aislados activos.	11
4.3.1 Obtención de organismos.....	11
4.3.2 Preparación de inóculo viral.	12
4.3.3 Bioensayo de virulencia.	12
4.4 Extracciones de ADN para determinación de carga viral.....	13
4.5 Cuantificación de ADN por espectrofotometría.....	14
4.6 Verificación de calidad de ADN extraído.	14
4.7 Cuantificación de carga viral.	15
4.8 Extracción y purificación de ADN para la secuenciación del genoma del WSSV.	
.....	15
4.8.5 Análisis estadístico.....	18

5. RESULTADOS	20
5.1 Biometría de camarones para activación de inóculos virales.....	20
5.2 Activación de inóculos de WSSV y bioensayo con tres aislados.	21
5.3 Biometría de camarones para bioensayo con tres aislados.....	22
5.4 Curvas de sobrevivencia de los tres aislados virales.	23
5.5 Cuantificación de carga viral de los tres tratamientos.....	24
5.6 Comparación de genomas e identificación de genes con variaciones.....	26
6. DISCUSIÓN	34
6.1 Evaluación de la virulencia de los aislados del WSSV.....	34
6.2 Secuenciación de genomas.....	36
6.3 Origen filogenético de los aislados secuenciados.....	37
6.4 Identificación de genes asociados a la virulencia.	38
7. CONCLUSIONES	41
8. REFERENCIAS	43

Índice de figuras

Figura 1 Biometría realizada a camarones <i>Peneaus vannamei</i>	20
Figura 2 Curva de sobrevivencia en la activación de los inóculos virales.	21
Figura 3 Biometría para bioensayo con tres aislados del WSSV, realizada a camarones <i>Peneaus vannamei</i>	22
Figura 4 Curva de sobrevivencia de camarones infectados con tres aislados del WSSV.	23
Figura 5 Amplificación por PCR de tiempo real del gen vp664 para determinar carga viral.	24
Figura 6 Carga viral de los tres aislados; CIAD, 2008 y Angostura.	25
Figura 7 Comparación de genomas en base a su tamaño y fecha de publicación.	27
Figura 8 Árbol filogenético comparando los genomas virales del aislado Angostura y 2008.	28
Figura 9 Alineamiento de los genomas de Angostura y 2008 con los encontrados en GENBANK.	29
Figura 10 Comparación de ORF 75 de Angostura y 2008.	31
Figura 11 Comparación de ORF 94 de Angostura y 2008.	32
Figura 12 Comparación de ORF 125 de Angostura y 2008.	33

Índice de tablas

Tabla 1	Año de colecta de muestra de genomas del WSSV secuenciados.	26
Tabla 2	Deleciones en los genomas de Angostura y 2008.....	30
Tabla 3	Porcentaje de similitud de los ORF 75, 94 y 125.....	31

1. INTRODUCCIÓN

El estudio de las interacciones entre patógenos y hospederos, ha permitido el desarrollo de protocolos y medicamentos eficaces contra las afecciones que pueden causar. En la actualidad el uso de herramientas moleculares y la caracterización de los genes implicados en las interacciones primarias con las barreras de defensa de los hospederos, generan información sobre las principales rutas de ataque de los patógenos. Por ello es de suma importancia mantener al margen las enfermedades en la industria, entre ellas la del cultivo de camarón que a nivel mundial generó entre 2.9 y 3.5 millones de toneladas, siendo el 80% producido en Asia-Pacífico. En el caso de América latina se produjo 700 mil toneladas de *Penaeus vannamei*, siendo Ecuador, México y Brasil los principales productores.(Europe, 2018). En México se cultivaron 130 mil 344 toneladas (SAGARPA, 2017), esto representa un valor aproximado de 711 millones de dólares (MDD) (Lealet *al.*, 2012), sin embargo la producción de camarón corre un constante peligro debido a las enfermedades que se presentan en los cultivos, como el síndrome del virus de la mancha blanca (WSSV), que se detectó por primera vez en las granjas de México en el año de 1999 (FAO, 2018).

Debido a las mortalidades que presenta en granjas camaronícolas, los cuales pueden llegar a ser del 100% en un periodo de tres a 10 días (Ramos, 2010). Se dice que el WSSV es el virus de mayor importancia e interés en la camaronicultura (Bateman *et al.*, 2012; Mejias and Peña, 2010). Las primeras apariciones del WSSV se dieron en China y Taiwán en los años de 1991-1992 en *Peneaus japonicus*, ocasionando mortalidades masivas y dispersándose por el resto de Asia (Morales & Cuéllar-Anjel, 2008.). El primer caso confirmado de WSSV en el continente americano, se presentó en un cultivo de *Penaeus setiferus* de una granja ubicada en Texas en el año de 1995, próxima a una planta de procesamiento de camarones de cultivo importados de Asia (Mejias and Peña, 2010). Se sabe que la propagación del virus se puede dar por varias vías, entre ellas; agua de lastre de los barcos, aves que actúan como vector y productos de importación ya sea vivo o congelado (Jeyasekaran *et al.*, 2013) En este último punto se ha demostrado que, aun estando congelado, si el tejido está infectado, mantiene su latencia para infectar a otros organismos, en caso de ponerse en contacto directo o con el medio en el que se encuentran (Sánchez-Paz, 2010), la transmisión puede ser horizontal por medio del canibalismo y partículas con WSSV que pasan a través de las branquias, y vertical vía transovárica (Durán-Avelar *et al.*, 2015a).

El WSSV pertenece a la familia Nimaviridae, genero Whispovirus, su ADN es de doble hebra, tiene una forma elíptica con un tamaño aproximado de 250-380 nm de longitud por 80-120 nm de ancho, y cuenta con un apéndice en forma

de filamento (Li *et al.*, 2017b). Los genomas secuenciados del WSSV desde su aparición en 1995 en Taiwán, presentan diferencias en sus tamaños, que van desde 293 a 307 kb. Debido a estas diferencias, se han planteado dos hipótesis yuxtapuestas: 1) La reducción del genoma incrementa la virulencia (Sun *et al.*, 2014) y 2) La reducción del genoma reduce la virulencia (Huang *et al.*, 2013). Lamentablemente estas discrepancias no han sido resueltas debido a que existen diferencias entre las investigaciones en; diseño experimental, especie hospedera y técnicas moleculares utilizadas.

La investigación realizada por Fang Li (Li *et al.*, 2017a), expone las diferencias entre aislados con la intención de demostrar como las delecciones, inserciones y sustituciones en partes del genoma afectan la virulencia del WSSV, debido a la posible variación en las proteínas de envoltura y genes de expresión inmediata temprana (Immediate Early Gene, IEG) encargados de codificar proteínas reguladoras que controlan la expresión viral, cambiando la función de los genes de acogida y eliminando la barrera de defensa del hospedero. Al comparar 3 aislados con diferente tamaño, (de 309,286 pb a 284,148 pb) se detectaron 34 genes menos, lo cual representa un 20% de variación con referencia al aislado de mayor tamaño. De estos genes, 6 pertenecen a la envoltura viral (Wsv 237/vp41A, Wsv 238/ vp52A, Wsv 338/vp62, Wsv 339/vp39, Wsv 077/vp36A, y Wsv 242/ vp41B) y 2 genes son de expresión inmediata temprana (IEGs, Wsv 108 y Wsv 178). La funciones de las proteínas mencionadas anteriormente están estrechamente relacionadas y componen diferentes rutas de

infección que posee el virus sobre el hospedero. Por lo que su estudio permite caracterizar algunas diferencias entre aislados.

Un estudio de genética realizado en 350 individuos recolectados en la zona noroeste de México (Nayarit, Sinaloa y Sonora) entre 2010 y 2012 (Durán-Avelar *et al.*, 2015a), compara el número repeticiones variables en tándem (VNTR) para los Marcos abiertos de lectura (ORFs) 75, 94 y 125 detectando 17, 43 y 66 haplotipos diferentes respectivamente, de las cuales los ORFs 94 y 125 mostraron gran variedad haplotípica, en contraste con ORF 75 que tiene una baja diversidad. Los autores sugieren que la alta tasa de mutación en estos ORF y en conjunto con las diferentes rutas de infección, ayuda a mantener altos índices de virulencia sobre el hospedero.

Existen diversas investigaciones sobre la caracterización de genes del WSSV que permiten identificar su función y mecanismos de infección con su hospedero (Hidayani *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2014). Lo que permite, junto con la creación de bibliotecas virtuales, comparar las secuencias de distintos aislados, comprender la interacción entre proteínas patógeno-hospedero y las interacciones que tienen las proteínas del virus entre sí. Gracias a las nuevas tecnologías, como la secuenciación directa de fragmentos cortos de ADN y la secuenciación paralela masiva, (Sanger *et al.*, 1977), se ha podido indagar en los genomas y transcriptomas de los organismos, profundizando y comparando sus diferencias evolutivas (López de Heredia, 2016). Estas técnicas en conjunto con la Q-PCR, ayuda la elaboración de pruebas moleculares que permiten la detección y cuantificación de patógenos. En este trabajo se investiga la interacción que

tienen diferentes aislados del virus de la mancha blanca (WSSV) en camarón blanco *Penaeus vannamei*. En diferentes bioensayos realizados en el Laboratorio de Patología Experimental Acuícola de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California (LPEA-FCM-UABC) se han observado que diferentes aislados virales tienen diferente grado de virulencia en el camarón por lo que este trabajo está enfocado a verificar dichas observaciones e identificar las posibles causas, con el uso de herramientas moleculares.

1. JUSTIFICACIÓN

Debido a la gran demanda y el valor del mercado de la industria de la camaronicultura a nivel mundial y los estragos que causa la infección por WSSV, es necesario conocer y entender los mecanismos patológicos de infección desde un punto de vista molecular. Los virus poseen la capacidad de mutar y adaptarse a los sistemas de defensa de sus hospederos para incrementar su virulencia. Se sabe también que los camarones generan mecanismos de resistencia o susceptibilidad a patógenos específicos resultando en un proceso evolutivo de acomodación viral que finalmente permite subsistir a ambas especies.

El conocer las diferentes estrategias de infección a través de las variaciones en los genomas de cepas del WSSV con diferente grado de virulencia, ayudaría a localizar los genes que tienen un papel importante en la propagación viral. Su correcta identificación permitiría desarrollar estrategias para poder suprimirlos con las nuevas tecnologías de manipulación genética y generar tratamientos efectivos contra el WSSV.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar genes del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) asociado con virulencia en camarón.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar, en condiciones de laboratorio, el grado de virulencia de tres aislados del WSSV en camarón blanco *Peneaus vannamei*.
- Secuenciar los genomas de los aislados usados.
- Identificar el origen filogenético de cada aislado comparado con los disponibles en bases de datos genéticos.
- Identificar las secuencias de genes asociados con la virulencia, en los genomas secuenciados y establecer una relación con el grado de virulencia.

3. HIPÓTESIS

Existen diferentes grados de virulencia del WSSV sobre el camarón, manifestándose con variaciones en los tiempos de mortandad; A mayor virulencia; mayor mortandad en menos tiempo post-infección.

Las secuencias de los diferentes aislados virales experimentales reflejarán diferencias nucleotídicas y de tamaño.

La comparación de los genomas de los aislados experimentales con los publicados en las bases de datos reflejará diferencias de secuencias, diferentes números de genes y diferente origen filogenético.

Las anotaciones de genomas y secuencias disponibles en las bases de datos genéticas permitirán identificar los genes están involucrados en la virulencia.

Se espera que las mutaciones funcionen como mejoras adaptativas, que favorecen la infección y propagación del patógeno ante el sistema inmune innato del hospedero.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Preparación de inóculos virales (WSSV).

Se dispone de tres muestras diferentes de camarón, infectadas por diferentes brotes de WSSV, una procedente del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) ubicado en Mazatlán Sinaloa, y otros dos obtenidos durante brotes en granjas acuícolas en Angostura, Sinaloa (proporcionado por la empresa Aquapacific S.A. de C.V.) y Sonora en el 2008 (Proporcionado por el Dr. Jorge de la Rosa Vélez Q.P.D.). Estas muestras de tejido de camarón se tenían guardadas en un ultracongelador (BioRad Revco™) a -80°, por lo cual fue necesario reactivarlas. Los inóculos virales fueron activados a partir de extractos de estas muestras en camarones vivos.

De cada inóculo, procesado por separado, se tomaron 25 mg de tejido de cuatro camarones muertos, se colocaron en un tubo de eppendorf de 1.5 mL, posteriormente se agregó 500 µL de buffer TN (filtrado por 0.2 µm) y se homogenizó con un pistilo, después se adicionaron 400 µL más de buffer TN. Las muestras fueron centrifugadas a 1000 g por 5 min, 3000 g por 5 min, 10,000 g por 5 min y 14,000 g por 15 min. El sobrenadante fue recuperado con una jeringa de 3 mL y se filtró nuevamente con un microfiltro de 0.45 µm. El filtrado se depositó en un tubo nuevo eppendorf de 1.5 mL, conservado a -4 °C hasta su uso un par de horas después, nunca más de 6 horas. Este mismo procedimiento se realizó cada vez que se infectaron camarones.

4.2 Activación de inóculos.

Posterior a la elaboración de los tres inóculos (F1 y F2), se procedió a la infección de estos camarones. Se hicieron 2 réplicas de cada aislado con 5 camarones cada una, en peceras de 40L. Los organismos tenían una longitud de 12 ± 0.8 cm y un peso de 14.4 ± 2.6 g.

Cada inóculo fue activado inyectando con jeringas para insulina de 1 mL, 20 μ L en 5 camarones (*Peneaus vannamei* -línea ecuatoriana) vía intramuscular entre el 5^{to} y 6^{to} segmento abdominal. El mismo procedimiento se repitió en dos ocasiones (F1 y F2) proveniente de la granja acuícola Aquacultura Mahar (Pichilingue, La Paz, Baja California Sur, México). Todos los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Patología Experimental Acuícola (LPEA) de la Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California (FCM-UABC).

Cada grupo de camarones fue infectado con su tratamiento correspondiente (CIAD-Mazatlán, 2008-Sonora, Angostura-Sinaloa y control negativo, es decir sin virus). Se mantuvieron las mismas condiciones en las peceras y se tomaron los tiempos de muerte post-infección de cada uno de los camarones que fueron muriendo, congelándolos inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente almacenados a -80 °C.

4.3 Comparación de virulencia entre aislados activos.

4.3.1 Obtención de organismos.

Los camarones utilizados para el bioensayo de comparación de virulencia de los aislados fueron *Peneaus vannamei* -línea mexicana), recolectados en la granja acuícola ACUAMOS ubicada en Km. 53.5 carretera a San Felipe. Mexicali B.C. Se transportaron en bolsas de plástico transparente con agua del mismo estanque en que se recolectaron, saturadas con oxígeno y se disminuyó la temperatura a 18 °C para bajar el consumo de oxígeno y la actividad durante el transporte. Se recibieron en tanques circulares de plástico con capacidad de 1000 L a una temperatura de 28 ± 1 °C, una salinidad de 34 ppt. Los camarones (n=500) se alimentaron con pellet al 25% de proteína (VIMIFOS) y al 3% de su biomasa repartida dos raciones diarias durante una semana.

Posteriormente se trasladaron dentro del LPEA, se incrementó la temperatura gradualmente hasta tenerlos a 28 ± 1 °C y una salinidad de 34 ppt con aireación constante y un filtro biológico. Se mantuvieron durante una semana bajo estas condiciones y con una alimentación del 3% de su biomasa dividida en dos raciones diarias.

4.3.2 Preparación de inóculo viral.

A partir de 4 camarones muertos de cada aislado, se tomaron 25 mg de tejido por organismo, se realizó el extracto viral para infectar, siguiendo el mismo protocolo de preparación de inóculo tal como se describió en la sección 4.1.

4.3.3 Bioensayo de virulencia.

Para la aplicación del tratamiento con los diferentes aislados, en la zona de infección se acondicionaron 3 peceras de 40 L por cada inóculo viral, con una temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 1$, salinidad de 34 ppt, aireación constante y filtro biológico, de igual manera en zona control se tenían replicas sin tratamiento aplicado. Se realizó una biometría de los organismos antes del tratamiento, teniendo una longitud promedio de 14 ± 0.117 cm y un peso de 15.72 ± 0.499 g.

El tratamiento fue aplicado con jeringas de insulina de 1 mL, administrando 20 μL de inóculo viral intramuscular entre el 5^{to} y 6^{to} segmento abdominal. Las condiciones de temperatura, salinidad y aireación se mantuvieron constantes (28°C , 34 ppt), cada organismo que moría o se encontraba moribundo fue recolectado. Se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido envueltos individualmente en papel aluminio con la nota correspondiente a su fecha, hora y cepa inoculada. Los camarones recolectados fueron almacenados a -80°C .

4.4 Extracciones de ADN para determinación de carga viral.

Una vez terminado el segundo bioensayo se procedió a extraer el ADN de las muestras (n= 63), se tomaron 100 mg de tejido del 5^{to} segmento abdominal y colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL, se adicionó 300 µL de amortiguador de lisis SNET [20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 5 mM EDTA, pH 8.0; 400 mM NaCl; 1% SDS], 3 µL de proteinasa K [10 mg/mL] y 2 µL de RNasa A [10 mg/mL]. Se maceró el tejido con un pistilo estéril hasta deshacerse y se incubó durante 45 minutos a 55°C con agitación constante. Después se centrifugó por 5 minutos a 11,000xg y se transfirió el sobrenadante a un tubo de centrifuga limpio, donde se añadieron 300 µL de Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico [25:24:1], se aplicó agitación con vortex por 15s para después centrifugarse a 11,000xg. El sobrenadante (fase acuosa), se transfirió a un tubo eppendorf limpio y se le agregó 300 µL de isopropanol, posteriormente se incubó 10 minutos a -70 °C. Para la precipitación total del ADN se centrifugó a 13,250xg por 15 minutos y se eliminó el isopropanol por decantación. El lavado del precipitado se realizó agregando 500 µL de etanol frío al 70% y centrifugándolo por 5 minutos a 13,250xg. El etanol se descartó por decantación y el ADN se resuspendió en 30 µL de agua ppi (agua Milli-Q y libre de fosfatos) para ser almacenado a -20 °C.

4.5 Cuantificación de ADN por espectrofotometría.

La cuantificación de ADN por espectrofotometría se realizó con un Nanodrop LITE (marca Thermo), usando 1 μ L de agua ppi como blanco y 1 μ L de muestra por medición. Se obtuvieron lecturas a 260 nm con concentraciones en ng/ μ L y ratios de 260/280 para identificar posible contaminación.

4.6 Verificación de calidad de ADN extraído.

Para observar la calidad de las extracciones de ADN, se realizaron electroforesis con geles de agarosa al 1% en 40 mL de TAE 1X (0.04 M Tris-acetato, 1 mM EDTA), se agregaron 0.40 mg de agarosa, aplicando agitación y calor hasta disolverse. Después en una campana de extracción se agregó 1 μ L de Bromuro de etidio BrEt [10mg/mL], se dejó reposar en un molde hasta solidificarse. El gel se puso en la cámara de electroforesis y se adicionó 1 μ L [500ng] de muestra y 2 μ L de buffer de carga 6x (azul de bromofenol). Se programó la cámara en 5 minutos a 50v y después a 55 minutos a 90v. Finalmente se observó por foto-documentador mediante irradiación con luz ultravioleta (T1202 Sigma Chemical Company Kodak) y una cámara fotográfica (DC290 ZOOM Kodak).

4.7 Cuantificación de carga viral.

La carga viral se determinó por PCR en tiempo real (Q-PCR) de acuerdo con Durand & Lightner, 2002 (procedimiento de la OIE), en un termociclador StepOnePlus (ABI). Se hizo una reacción a 25 µL adicionando; 8.5 µL de agua ppi, 12.5 µL de sonda TAQ-MAN, buffer 2X para cuantificación estándar de VP664, 1 µL de Primer Forward WSS1011 [7.5µM], 1 µL Primer Reverso WSS1079R [7.5 µM], 1µL de sonda [375 µM] y 1 µL de muestra de DNA [50 ng/µL].

Las condiciones para el Q-PCR fueron las siguientes; 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, 15 segundos (40X) a 95°C y 1 minuto (40X) a 60°C.

En cada corrida se incluyó una curva estándar usando 10 µL de plásmido con el inserto de vp664 de 64 pb en diluciones 10^0 a 10^7 .

4.8 Extracción y purificación de ADN para la secuenciación del genoma del WSSV.

Para la secuenciación masiva de los aislados virales, se extrajo y purificó el ADN de 4 organismos congelados a partir del bioensayo de virulencia que dieron positivo al WSSV por PCR y dos controles negativos. Para la extracción de ADN se utilizó el Kit 5 Prime Archive Pure DNA blood kit 30 mL (#2900258), siguiendo el protocolo a partir de 30 mg de músculo de cada camarón. El tejido se homogenizó en 900 µL de RBC Lysis solution, se invirtió 10 veces durante 1

minuto de incubación a temperatura ambiente. Después se centrifugó por 20 segundos a 13,000xg, se retiró el sobrenadante dejando entre 10 y 20 μL junto con el pellet. Para resuspender el pellet se aplicó vortex durante 10 segundos, se añadieron 300 μL de Cell Lysis Solution y 1.5 μL de solución de RNAsa A. Las muestras se incubaron durante 15 minutos a 37 °C con baja agitación, después se colocaron las muestras sobre hielo por 1 minuto. Se añadió 100 μL de Protein Precipitation solution y aplicó vortex por 20 segundos, para observar el precipitado proteico, se centrifugaron las muestras a 13,000xg por 1 minuto. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio con 300 μL de isopropanol al 100 % y frío. Finalmente se mezcló por inversión 50 veces.

El segundo paso se realizó de dos formas, se dividieron las muestras y se utilizó una columna para tratar a la mitad, mientras que las otras siguieron el protocolo normal, esto debido a que se requiere de 100nL/uL y un volumen mínimo de 40uL para la secuenciación.

4.8.1 Protocolo de extracción de ADN para secuenciación masiva con columna.

La mitad de las muestras suspendidas en isopropanol fueron incubadas con DNA a temperatura ambiente por 5 minutos, después se transfirió a una columna Econo Spin (marca Epoch #1910-250), se centrifugó a 11,000xg durante 1 minuto, para descartar el filtrado obtenido. Se añadieron 500 μL de buffer de lavado Tipo 1 (GE 28-9031-70) seguido de centrifugación a 11,000xg por 1 minuto,

descartando el líquido filtrado, se repitió la centrifugación para secar el filtro. La columna fue transferida a un tubo limpio y se agregaron 50 µL de agua ppi, dejándolo reposar por 1 minuto. Por último, se centrifugó a 11,000xg por 1 minuto, descartando la columna, para proceder con la cuantificación como se indica en el paso 4.8.3.

4.8.2 Protocolo sin columna.

El grupo de muestras que fueron re-suspendidas en isopropanol fueron centrifugadas a 13,000xg por 1 minuto, hasta observar un pellet. Se desechó el sobrenadante y añadieron 300 µL de etanol al 70% y se agitó por inversión varias veces, hasta lavar el pellet. Se centrifugó a 13,000xg por 1 minuto, para posteriormente eliminar el etanol por decantación. Se añadieron 100 µL de DNA Hydration Solution y aplicó vortex a velocidad máxima por 5 segundos, finalmente se incubaron durante 5 minutos a 65 °C.

4.8.3 Cuantificación por espectrofotometría.

Para cuantificar el ADN se utilizó un Nanodrop Lite (Thermo®), como blanco para la cuantificación del protocolo sin columna se utilizó 1 µL de DNA Hydration Solution y con la que se resuspendió la muestra, mientras que, como blanco del protocolo con columna, se utilizó 1 µL de agua Ppi, en ambas mediciones se utilizó 1 µL de muestra. Las lecturas obtenidas a 260 nm, mostraron concentraciones en ng/µL y ratios de 260/280, para detectar contaminación por proteínas o fenoles.

4.8.4 Preparación de muestras para enviar a secuenciar.

Las muestras de DNA extraído se prepararon para enviar a secuenciar al Instituto de Acuacultura de la Universidad de Stirling en Escocia. Para ello fue necesario estabilizarlas, debido a la posible degradación durante el transporte. Este procedimiento se realizó con un estabilizador DNASTable Plus® (Biomatrix, UK). Las muestras que fueron pasadas por columna, se le adicionaron 12.5 µL de DNASTable a 50 µL de muestra y a las muestras que no fueron tratadas con columnas, se le agregaron 25 µL de DNASTable a 100 µL de muestra. Manteniendo la proporción 1:4 sugerida por el fabricante.

4.8.5 Análisis estadístico.

Las biometrías y % de sobrevivencia se graficaron en Graph Pad Prism 2007 ver. 5.01 para Windows, para las biometrías se usó la gráfica Sactter plot, horizontal y se graficó la media con el error estándar (SEM), n=15.

Las curvas de sobrevivencia se graficaron con point to point indicando las barras de error estándar. Los datos de las biometrías, de % de sobrevivencia y carga viral se analizaron con una prueba de Normalidad chi-cuadrada y se aplicó una prueba T no paramétrica ($p < 0.05$) con el programa Excel Office 365 para Windows.

4.8.6 Árbol filogenético

La alineación se realizó con 1000 repeticiones de bootstrapped utilizando MAUVE, obteniendo porcentajes de similitud que se indican sobre o a un costado de las ramas de los árboles filogenéticos. Se realizaron comparaciones con los aislados de WSSV de 2008 y Angostura y los de GENBANK.

4.8.7 Alineamiento de genomas

El alineamiento del genoma secuenciado de Angostura y 2008, se realizó con el programa Gram Align/RAXML (probabilidad máxima aleatoria acelerada), junto con las secuencias encontradas en GENBANK, usando como genoma de referencia el GCF_000848075.2 que corresponde a la secuencia KT995472.1 originaria de China.

5. RESULTADOS

5.1 Biometría de camarones para activación de inóculos virales.

Para activar el inóculo se usaron camarones provenientes de la granja Acuacultura Mahar (línea ecuatoriana), se pesaron y midieron 30 individuos, obteniendo una longitud promedio de 12 ± 0.8 cm y un peso promedio de 14.4 ± 2.6 g.

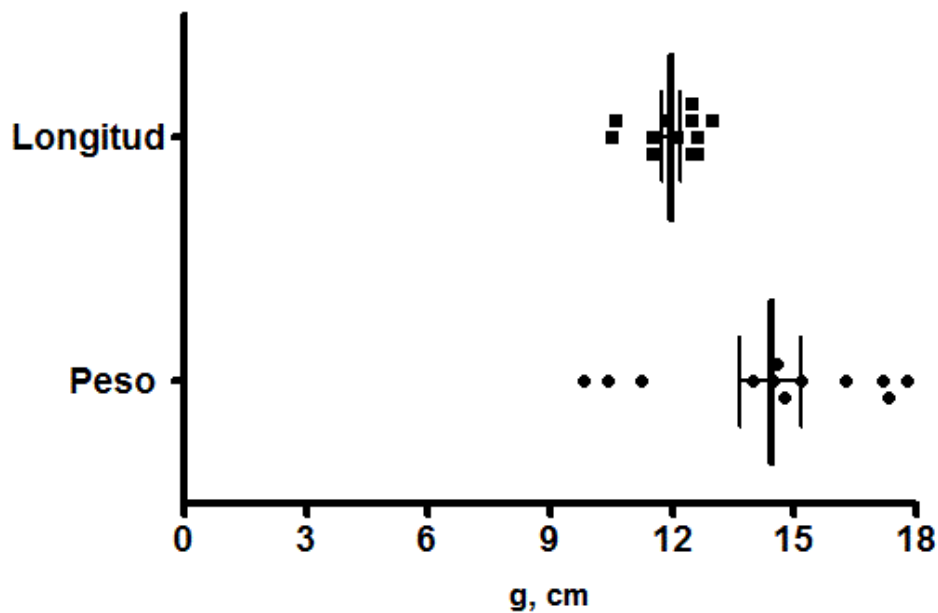


Figura 1 Biometría realizada a camarones *Peneaus vannamei*. Para activación de inóculo viral. Barras de error indican el error estándar (n=30).

5.2 Activación de inóculos de WSSV y bioensayo con tres aislados.

Después de realizar la biometría como se indica en la figura 1, se colocaron 5 camarones por pecera con dos replicas por tratamiento; CIAD, Sonora 2008 y Angostura. Se inyectaron 20 μ L de inóculo a cada camarón. Se monitoreó la sobrevivencia, encontrando diferencias significativas entre tratamientos (Fig. 2). El aislado del CIAD tuvo una sobrevivencia del 60% en la réplica#1, la réplica 2 fue descartada debido a problemas con la aireación. El tratamiento con el aislado del 2008 presentó 0% de sobrevivencia en su réplica 1 a las 66:17 HPI y a las 67:54 HPI en la réplica 2. En el aislado de Angostura del tratamiento 3, se observó 0% de sobrevivencia en su primer replica a las 68:57 HPI, mientras que en la segunda replica fue a las 70:55 HPI.

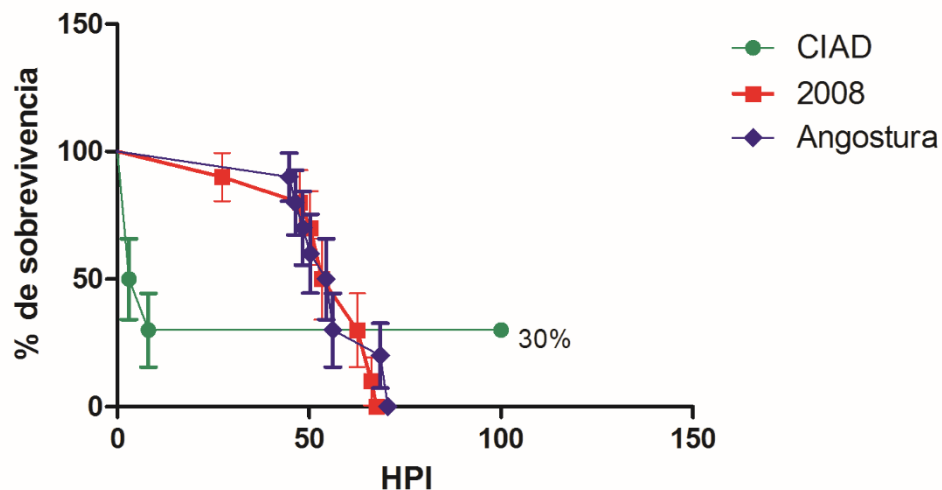


Figura 2 Curva de sobrevivencia en la activación de los inóculos virales. Los aislados de 2008 y Angostura tienen similitud en los tiempos de sobrevivencia, mientras que CIAD obtuvo el 30% de sobrevivencia a las 100 hpi. hpi, horas post infección.

5.3 Biometría de camarones para bioensayo con tres aislados.

Después de haber realizado la activación de los inóculos y haber comprobado que aun generaban mortalidad, se realizó de nueva cuenta una biometría (Fig.3). Los organismos fueron colectados en AQUAMOS, granja acuícola ubicada en la carretera Mexicali-San Felipe B.C. Se obtuvieron los pesos y tallas de 15 camarones, obteniendo una de longitud promedio de 14 ± 0.117 cm y peso promedio de 15 ± 0.499 g. Para el bioensayo, donde se comparó la virulencia de los tres aislados por triplicado, se colocaron colocando 7 camarones por replica en peceras de vidrio de 40L, con las mismas condiciones que se tuvieron en la activación de los inóculos (Fig. 4).

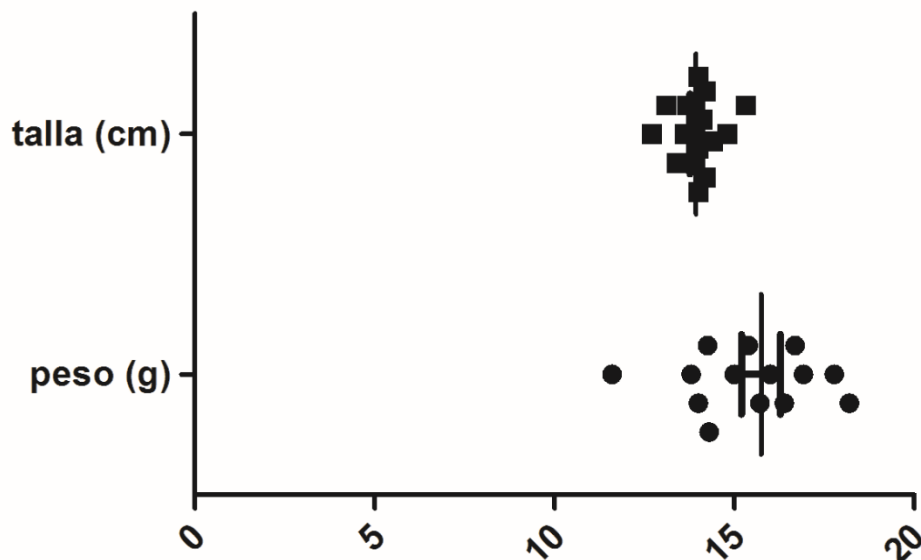


Figura 3 Biometría para bioensayo con tres aislados del WSSV, realizada a camarones *Peneaus vannamei*. Las barras indican el error estándar (n=15).

5.4 Curvas de sobrevivencia de los tres aislados virales.

El tratamiento del CIAD presentó una sobrevivencia del 14.3 % 10 días después de comenzado el desafío, con su primera baja a las 29:40 HPI y la última baja a las 145:50 HPI. El tratamiento con el aislado del 2008 tuvo una mortandad total a las 168:40 HPI, presentándose la primera baja a las 27 HPI. En el aislado de Angostura se obtuvo una mortalidad del 100% a las 168 HPI (horas post infección), mostrando la primera baja a las 35 HPI.

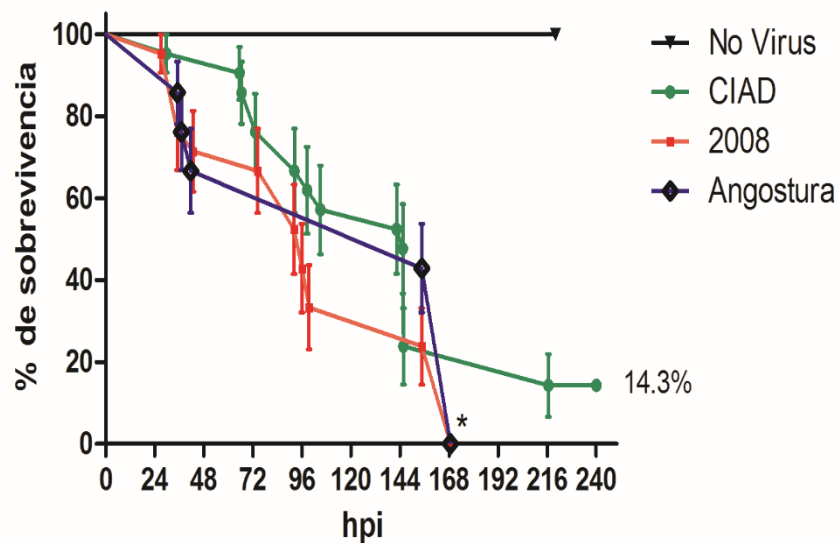


Figura 4 Curva de sobrevivencia de camarones infectados con tres aislados del WSSV. Se observa el comportamiento de los 3 tratamientos aplicados por triplicado y un control libre de virus. Hpi, horas post-infección; *, significa diferencias significativas en el tiempo de supervivencia (prueba Log-rank). 3 réplicas para cada tratamiento, n = 7.

5.5 Cuantificación de carga viral de los tres tratamientos.

Para comparar la carga viral entre los tratamientos, se realizaron análisis de Q-PCR a todos los camarones infectados. Para ello se utilizaron cebadores para amplificar el gen que codifica para la proteína vp664 en condiciones estándar para la realización de la curva estándar y el perfil de amplificación (Fig.5A y B).

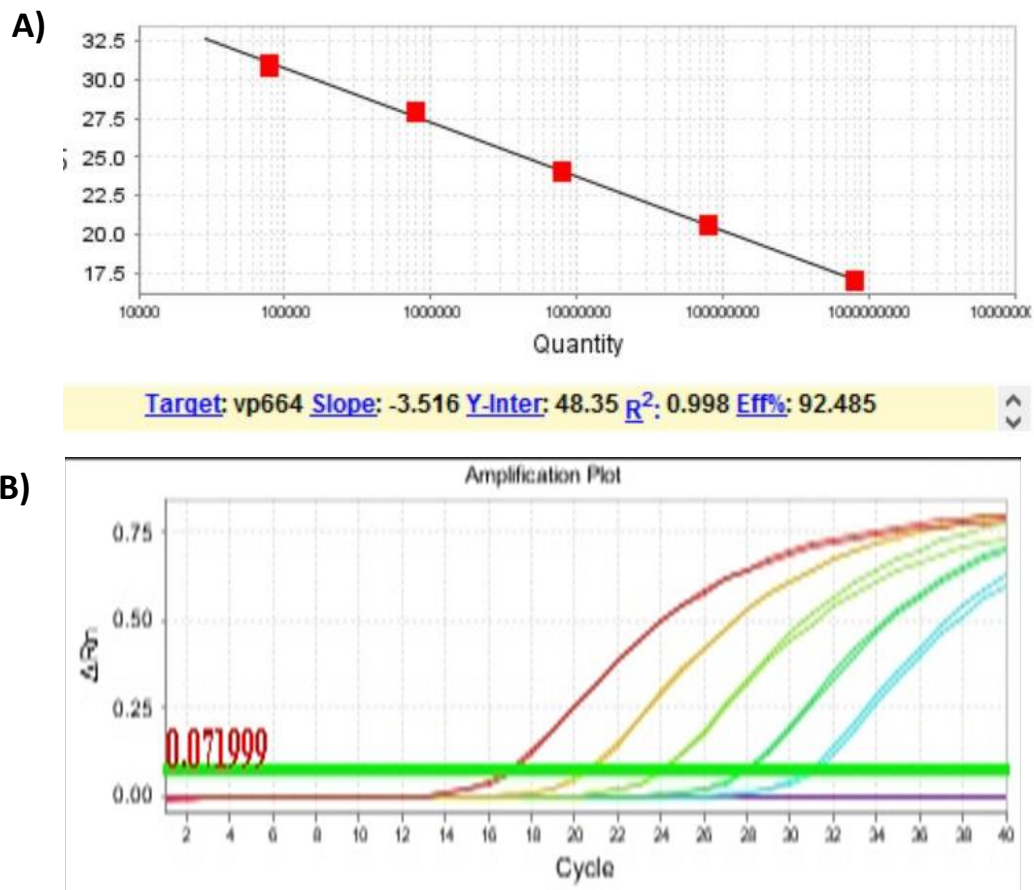


Figura 5 Amplificación por PCR de tiempo real del gen vp664 para determinar carga viral. A) Curva estándar en diluciones de 1×10^0 a la 1×10^7 , con concentraciones de $7.93E+05$ a $7.93E+08$ copias por μL . Los valores de la pendiente están dentro de los intervalos recomendados para este tipo de análisis. B) Perfil de amplificación en número de ciclos de vp664 en 5 diluciones de 1×10^5 a 1×10^9 .

La carga viral expresada en los diferentes tratamientos demostró diferencias (Fig.7), el aislado del CIAD y 2008 con concentraciones virales menores ($8.48\text{E}+07$ y $1.26\text{E}+08$) que el aislado de Angostura el cual presentó un promedio de número de copias de $1.91\text{E}+08$. En base a esto se puede observar como el aislado de la Angostura, con mayor carga viral es el que presenta una mortalidad mayor, con un 100% en el bioensayo y en menor tiempo.

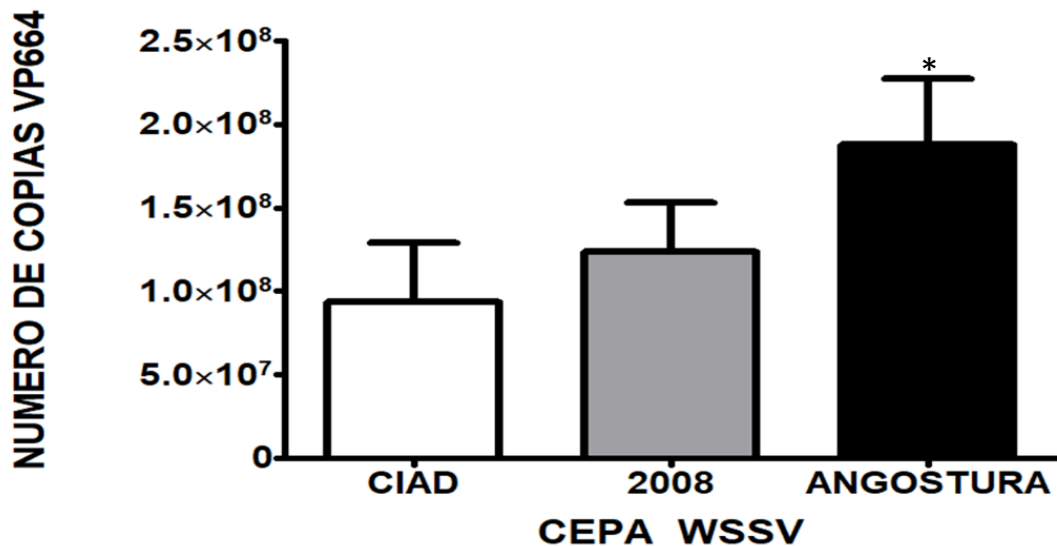


Figura 6 Carga viral de los tres aislados; CIAD, 2008 y Angostura. * indica diferencias significativas, las barras de error representan el error estándar.

5.6 Comparación de genomas e identificación de genes con variaciones.

El tamaño del genoma de los aislados secuenciados 2008 y Angostura se encontró entre los más bajos, presentando un tamaño de 289 350 pb en el aislado de Angostura y 288 995 pb en el aislado de 2008, 19 936 pb menos para Angostura en comparación con el genoma de China (KT995472,1). El porcentaje de GC se mantiene en un promedio de 41.1%.

La diferencia en tamaño de los aislados de México 2008 (KU216744) y el aislado del 2008 de este estudio, pueden indicar que son muestras de diferentes brotes del virus en Sonora, ya que entre los aislados de 2008 y Angostura existe una diferencia en tamaños y ubicación geográfica de donde fueron tomadas las muestras.

Tabla 1 Año de colecta de muestra de genomas del WSSV secuenciados. Marcado en Gris se encuentran los genomas secuenciados de Angostura y 2008 de este trabajo.

Año	Origen	Especie	No. GENBANK	bp	%GC
1994	China	MJ	KT995472,1	309,286	40.9
1994	Taiwan	PM	AF440570,1	307,287	41
1996	China	MJ	AF332093,3	305,119	42
1996	Thailand	PM	AF369029,2	292,967	41.1
2008	Mexico 2008	LV	KU216744,1	293,183	41.4
2008	2008 Mexico	LV	C7B2A_S3	288,995	41
2010	China	PC	KT995470,1	294,261	41
2010	China	LV	KT995471,1	284,148	41
2011	south korea	LV	JX515788.1	295,884	40.9
2011	Angostura Mexico	LV	C5C2A_S2	289,350	41
2012	China	MJ	KY827813,1	281,054	41
2014	Egypt	PM	KR083866,1	305,119	41

MJ, *Marsopenaeus japonicus*; PM, *Penaeus monodon*; LV, *Penaeus vannamei*.

La comparación entre el origen y año de publicación entre aislados no muestra un orden lineal en su estructura, por lo tanto, no se podría atribuir el tiempo como un factor para la mutación del virus, como se muestra en la Fig. 7.

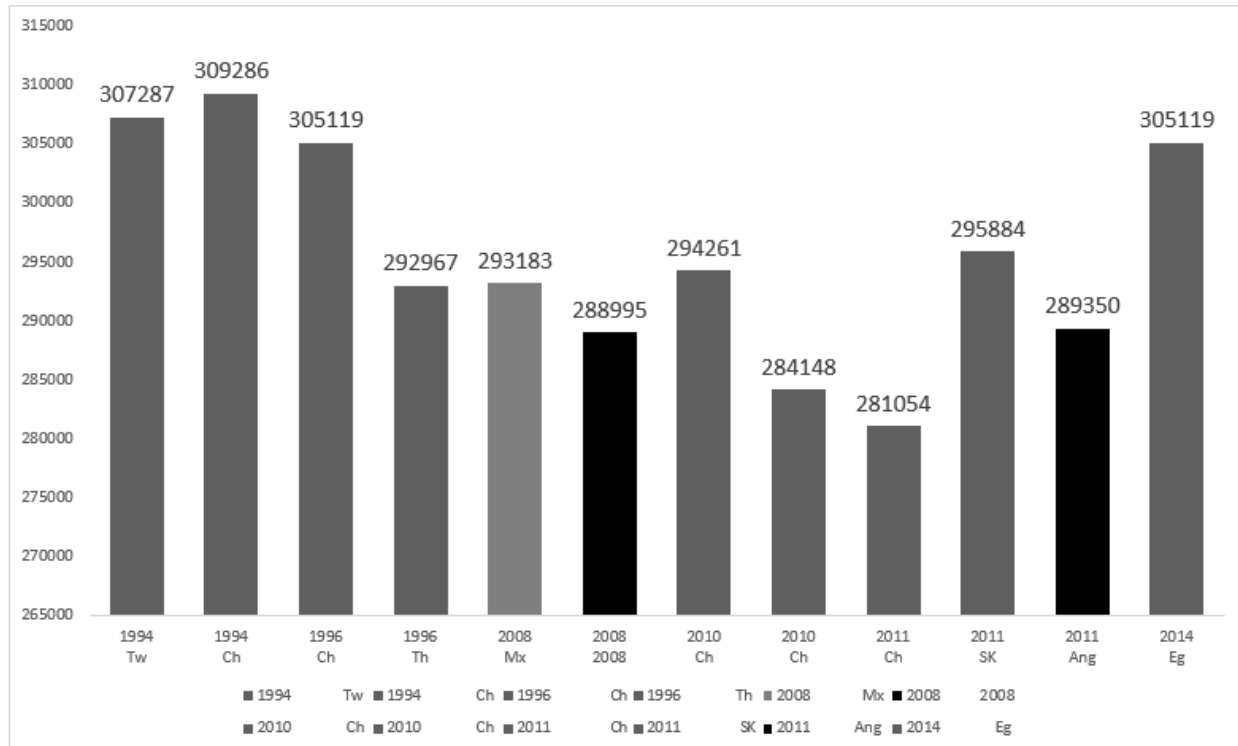


Figura 7 Comparación de genomas en base a su tamaño y fecha de publicación. *Los aislados de Angostura y 2008 aún no se han sometido a GENBANK, pero fueron comparados con los encontrados en esa base de datos. El número sobre las barras indica su tamaño en pares de bases.*

La comparación filogenética de los aislados de Angostura y 2008, con los aislados encontrados en GENBANK, los colocaron junto al aislado mexicano del mismo año (Fig.9). Las matrices de identidad resultantes del análisis por medio de Bootstrap demostraron un 82.7% en la repetición del nodo de la matriz del

aislado mexicano ya reportado, y un 75.6% de repeticiones en los aislados de Angostura y 2008, lo que permite fiabilidad al árbol.

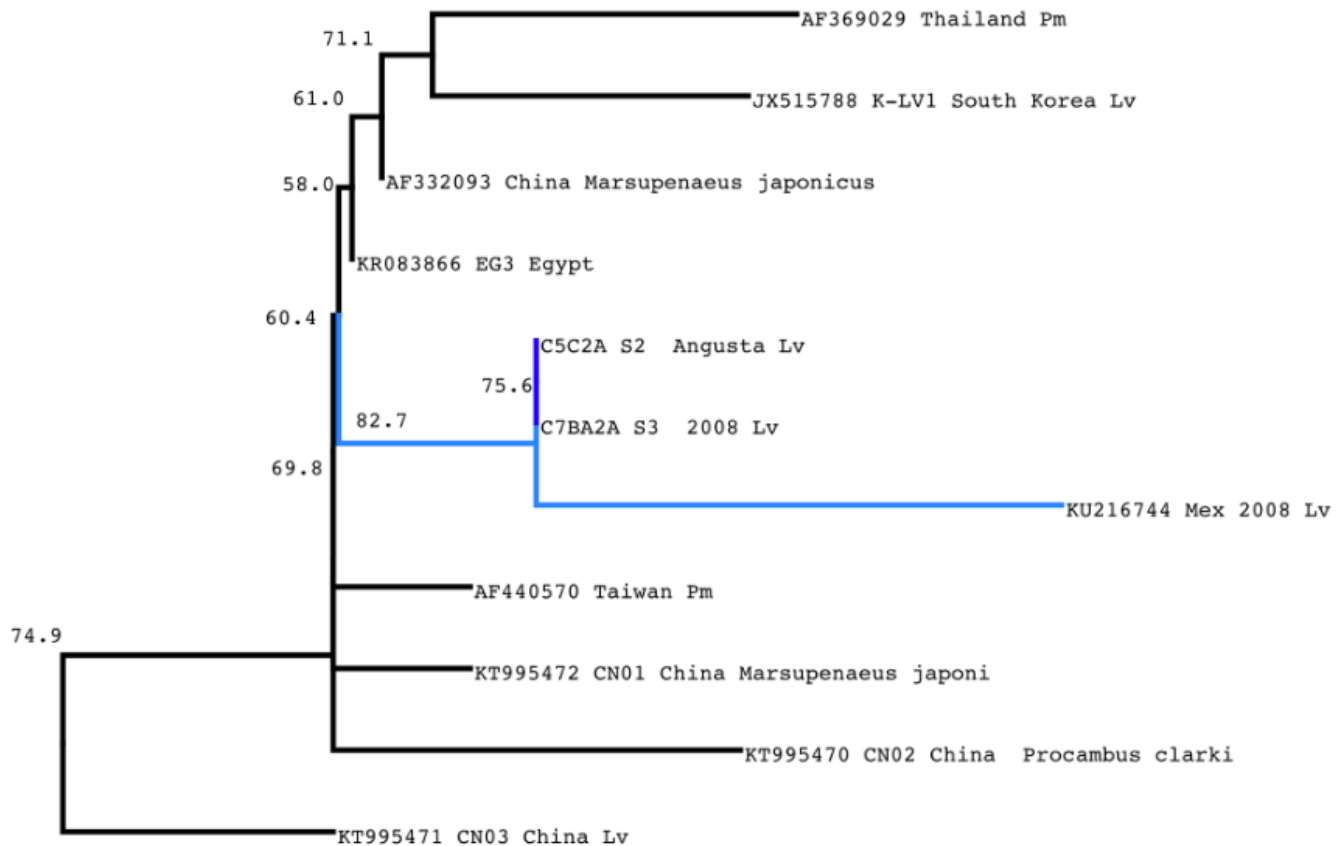


Figura 8 Árbol filogenético comparando los genomas virales del aislado Angostura y 2008. Se observa la alineación de los aislados que fueron enviados a secuenciar, junto con las otras secuencias encontradas en la base de datos del GENBANK. Los números indican porcentaje de similitud entre genomas.

La comparación de los genomas completos de las variantes de Angostura, 2008 y los genomas ubicados en GENBANK, se realizó con el programa Gram Align/RAxML (probabilidad máxima aleatoria acelerada). En donde se pueden

observar deleciones, inserciones y cambios de secuencia (Fig. 9), en comparación con el genoma de referencia (ViralProj14616), encontrado en GENBANK.



Figura 9 Alineamiento de los genomas de Angostura y 2008 con los encontrados en GENBANK. Barras azules: secuencia del genoma, línea de puntos: deleción en comparación con el genoma de referencia (KT995472.1), caja naranja: inserciones, caja verde (KT995471.1): cambio de secuencia.

Las deleciones encontradas pertenecen a 15 genes, de los cuales solo se conoce la función de tres (Tabla 2).

Tabla 2 Deleciones en los genomas de Angostura y 2008. De estos genes solo se conoce la función de 3, los cuales codifican para VP41A; WSV 237, VP52A; WSV 238 y VP41B; WSV 242 que son proteínas de envoltura

DELECIONES		
No.	GEN	FUNCION
1	WSV 234	Proteina hipotetica
2	WSV 237 (Vp41A)	Proteina de envoltura
3	WSV 238 (Vp52A)	Proteina de envoltura
4	WSV 242 (Vp41B)	Proteina de envoltura
5	WSV 244	Proteina hipotetica
6	WSV 247	Proteina hipotetica
7	WSV 463 a	Proteina hipotetica
8	WSV 263 b	Proteina hipotetica
9	WSV 463 c	Proteina hipotetica
10	WSV 463 d	Proteina hipotetica
11	WSV 489	Proteina hipotetica
12	WSV 490	Proteina hipotetica
13	WSV 492	Proteina hipotetica
14	WSV 493 (Vp35)	Proteina hipotetica
15	WSV 495	Proteina hipotetica

La comparación de los ORFs 75, 94 y 125 de los aislados de Angostura y 2008 contra los genomas de WSSV publicados en el GenBank, reflejan diferencias de similitud principalmente en el ORF 75 para el aislado de Angostura, mientras que el aislado 2008 mantiene un 100% de similitud en la mayoría de los ORFs con respecto a los genomas de GenBank (Tabla 3).

Tabla 3 Porcentaje de similitud de los ORF 75, 94 y 125. Los porcentajes de similitud se obtuvieron a partir de Megablast con los genomas de WSSV en GenBank.

Origen	Especie	No.GENBANK	Angostura			2008		
			ORF 75	ORF 94	ORF 125	ORF 75	ORF 94	ORF 125
China	Mj	KT995472	99.93	100	100	100	100	100
Korea del sur	Lv	JX515788	99.6	99.72	100	99.38	99.71	100
China	Pc	KT995470	98.69	100	97.89	100	100	97.75
China	Mj	AF332093	99.93	100	100	100	100	100
Egipto	Pm	KR083866	99.93	100	100	100	100	100
China	Lv	KT995471	99.66	99.72	99.46	100	99.71	99.43
China	Mj	KY827813	99.86	100	100	100	100	100
Taiwan	Pm	AF440570	99.93	100	100	100	100	100
Mexico 2008	Lv	KU216744	100	100	100	100	100	100
Tailandia	Pm	AF369029	99.79	99.44	100	100	99.42	100

El alineamiento de los dos ORFs 75 de los aislados de Angostura y 2008, no demostraron diferencias en sus nucleótidos, pero si en su tamaño como se observa en la figura 10, donde se ve que en Angostura es un 89% más grande en 2008, con un total de 1454 pb en comparación con los 161 pb de 2008.

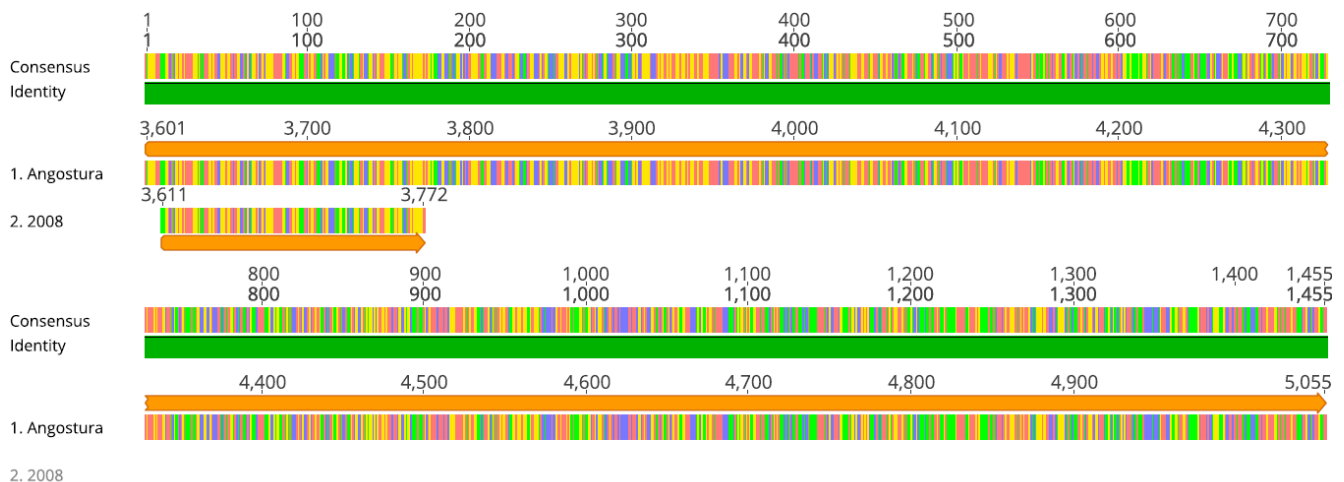


Figura 10 Comparación de ORF 75 de Angostura y 2008. Figura generada a partir de un alineamiento en Geneious 11.1.4.

La comparación de los ORFs 94 generaron un 96% de similitud como se observa en la figura 11, la diferencia se dio de igual manera en el tamaño siendo el ORF 94 del aislado de 2008 el más pequeño, con una diferencia del 3% al tener 342 pb contra los 354 pb de Angostura.

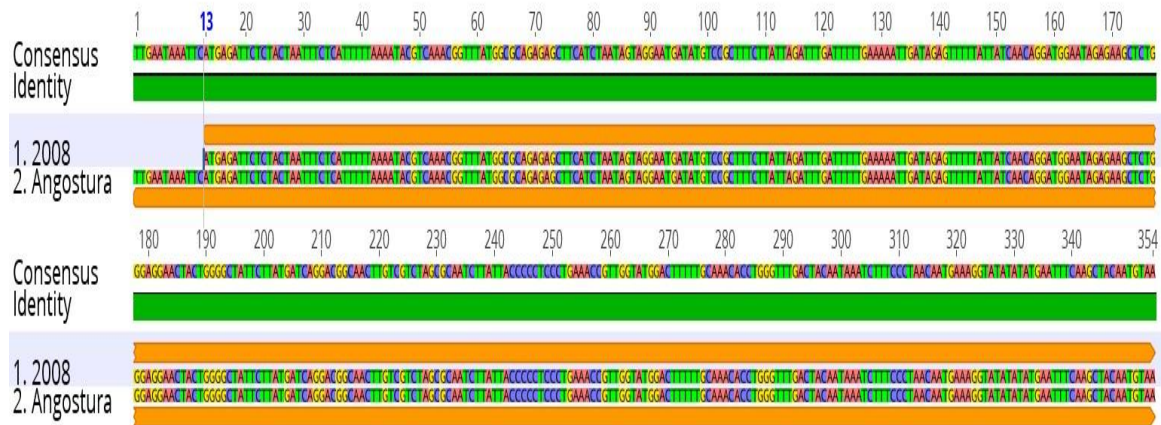


Figura 11 Comparación de ORF 94 de Angostura y 2008. Alineación realizada en Geneious 11.1.4

ORF 125 tampoco presentó diferencia en las posiciones de sus nucleótidos, pero también tuvo una diferencia en el número de pares de bases, como se ve en la figura 12, difiriendo en un 93% al encontrar un gap de 12 pb (6%), entre los aislados.

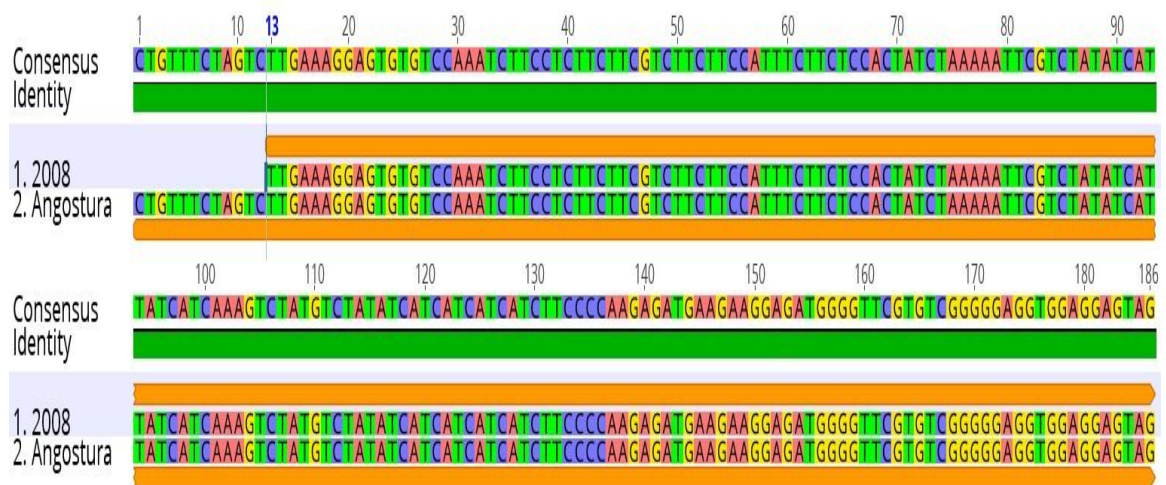


Figura 12 Comparación de ORF 125 de Angostura y 2008. Alineación realizada en Geneious 11.1.4

6. DISCUSIÓN

6.1 Evaluación de la virulencia de los aislados del WSSV.

En el bioensayo de virulencia los principales signos clínicos que se presentaron fueron; letargia, disminución en el consumo de alimentos, decoloración del hepatopáncreas, aflojamiento cuticular y urópodos rojos (Verbruggen et al., 2016). En el bioensayo realizado con los tres aislados del WSSV, se observó una diferencia en la sobrevivencia debido a que el aislado del CIAD, presentó sobrevivencia tanto en la activación del inóculo como en el bioensayo de virulencia, debido a que esta fue la única muestra que no se logró secuenciar por la baja concentración de ADN, no será posible encontrar diferencias más allá de lo observado a través de los signos clínicos y la carga viral comparativa:

Aunque la muestra del CIAD tuvo el 14.3% de sobrevivencia, se encontraba cercano a los datos publicados, donde se estima una mortalidad del 90 al 100% entre los 3 y 10 días post-infección (Pradeep *et al.*, 2012; Ramos, 2010). Sin embargo, esta sobrevivencia demostró que el aislado del CIAD presentaba una mortandad significativamente menor en comparación con los aislado de Angostura y 2008, presentando menor virulencia (Li *et al.*, 2017).

Se presentaron diferencias en la carga viral, siendo el aislado de Angostura el que tuvo mayor número de copias de los tres aislados. Sin embargo, estas diferencias están en el intervalo de datos publicados, como en el estudio realizado

por Duran y Lightner, donde se cuantificó por PCR tiempo real la carga viral del WSSV en tres especies de *Penaeus*; *P. vannamei*, *P. stylirostris* y *P. monodon*. obteniendo conteos de $2E+04$ a $9E+10$ en camarones moribundos (Durand and Lightner, 2002).

En la revisión para evaluar el riesgo asociado con el comercio de productos susceptibles a infección, realizado por Oidtmann y Stentiford (año), se reunieron los datos de concentraciones del WSSV obtenidas de tejidos de diferentes especies, entre ellas la especie *Penaeus*, encontrando cargas virales muy altas a inicios de la mortalidad, con concentraciones de $10E+09$ a $10E+10$. (B. and D., 2011).

Estas diferencias en las cargas virales del virus, podrían estar involucradas con la diferencia en la mortalidad (Gao *et al.*, 2014). Además, en los tratamientos se observaron los tiempos letales en base a las horas post-infección, encontrando que los organismos tratados con el aislado de 2008 tuvieron una mortalidad total a las 137 horas de haber tenido su primera baja, el tratamiento con el aislado de Angostura tuvo una mortandad del 100% en las 3 réplicas en menor tiempo (129 horas) de presentarse el primer muerto.

Es interesante remarcar que en el caso de los aislados de Angostura y 2008, se observó que una vez que moría un organismo dentro de una réplica, a los dos días morían los demás organismos del tratamiento. Esto junto con la carga viral, nos permite clasificar los aislados como de baja virulencia (CIAD), mediana

virulencia (2008) y alta virulencia (Angostura), lo que concuerda con lo presentado en la figura 4 de sobrevivencia del bioensayo.

6.2 Secuenciación de genomas.

Para identificar las diferencias entre aislados, se realizó la secuenciación de los genomas. Debido a problemas con la concentración y calidad de las muestras, no se pudo realizar la secuenciación del aislado del CIAD. Sin embargo, Angostura y 2008 lograron secuenciarse con éxito.

El aislado del 2008 presentó un tamaño de 288 995 pb, mientras que el aislado de Angostura tuvo 289 350 pb, ambos con un porcentaje de GC del 41%, similar a otros aislados (Verbruggen et al., 2016). La comparación con los otros aislados nos permite ver que se encuentran entre los más pequeños. Sin embargo, las diferencias entre tamaños no mantienen un orden con las fechas de toma de muestra de los genomas o los sitios geográficos (Fig. 7). Por otra parte, podemos observar en la tabla 1, que los genomas de WSSV obtenidos a partir de hospederos de la especie *Penaeus vannamei*, ninguno sobrepasó los 300 000 pb. Esto se puede relacionar con el alto índice de infección en *Penaeus* registrada por Oidtman (B. and D., 2011) y la posible infección múltiple que propone Marks (Marks et al., 2004), en donde expresa que podría ser causada por un efecto recombinatorio, provocando deleciones e inserciones, a partir de transposones que modificaron la cadena de ADN.

6.3 Origen filogenético de los aislados secuenciados.

En la representación del árbol filogenético mostrado en la fig. 9. Se pueden ver los porcentajes de repetición de cada nodo en la matriz, lo que nos permite determinar que es confiable al superar el 50% en cada nodo. También se puede observar como los aislados de Angostura y 2008 se colocaron junto a el otro aislado de México, lo cual corrobora que tienen un origen común, pero que sin embargo los aislados se han diferenciado ya que hay 355 pb de menos en el genoma del 2008 que en el de Angostura. Esto se puede deber a la posible resistencia que algunos camarones que presentan ante el virus o a las diferencias fisicoquímicas de los cultivos.

El uso de regiones específicas del WSSV para identificar el parentesco entre aislados, permite trazar una posible línea evolutiva y de segregación del virus. Los ORFs 75, 94 y 125 han sido estudiados por su alta tasa de variabilidad entre aislados (Durán-Avelar et al., 2015b). Al comparar los ORFs 75, 94 y 125 de los aislados de Angostura y 2008, con los genomas de WSSV del GenBank, se lograron encontrar diferencias en los porcentajes de similitud. Los ORF 75, 94 y 125 de los aislados Angostura y 2008 tuvieron diferencias entre cada aislado encontrado en GenBank, se obtuvo un 100% de similitud con el aislado mexicano reportado en todos los ORF.

ORF 75 del aislado de Angostura es el que tuvo mayor variabilidad con relación a los genomas encontrados en GenBank. En la tabla 3, se puede

observar como el aislado de Angostura se relaciona con un 99.93% con dos genomas de WSSV de China de los años 1994 y 1996, así como del aislado de Taiwán de 1994 y Egipto del 2014. Su mayor diferencia (98.69%) se encontró al compararlo con el genoma de China (KT995470). Por otra parte, el aislado del 2008 solo tuvo una diferencia y fue con el genoma de Corea del Sur, con un porcentaje de similitud del 99.38%, siendo este más bajo que los obtenidos para ORF 75 del aislado de Angostura. Se sabe que ORF 75 codifica para vp357, una proteína menor que contiene un dominio transmembrana que la podría colocar como proteína de envoltura, interactuando directamente con el hospedero (Marks, 2005). La comparación de ORF 75 entre aislados permite ubicarlos en grupos.

6.4 Identificación de genes asociados a la virulencia.

Para identificar si las delecciones de las proteínas en los aislados, estaban asociadas con la virulencia, se analizó la función de las proteínas vp41A, vp41B y vp51A en la literatura publicada, también se realizó un blast para observar si algunas de las otras delecciones se encontraban en las bases de datos del GENBANK, se identificó a WSV 493 codifica para vp35, un péptido de 228 aminoácidos, el cual se cree que contiene regiones acidas, se ha demostrado está relacionado con la regulación y activación transcripcional (Lan *et al.*, 2002).

El gen que codifica para vp41A (proteína de envoltura), interactúa con la proteína vp26, y con las proteínas envoltentes vp56 y vp28, pero no con vp24, vp31, vp32, vp39B y vp51A o vp52A (Huang et al., 2013). Vp26 también interactúa con la proteína viral envoltente vp51A y que a su vez esta interactúa con vp19 (Qiang Wan et al., 2008).

La interacción de vp26 con vp51A forma otro complejo proteico junto con vp28, hipótesis sugieren que vp26 puede estar anclada en su región hidrofóbica N-terminal a la envoltura, y su extremo C unido a la nucleocápside, mientras que vp51A es una proteína transmembranal de tipo II con un dominio transmembrana altamente hidrofóbico en su extremo N y un extremo C expuesto en la superficie del virión (Chang et al., 2008). Vp26 también interactúa con vp37 (Youtong et al., 2011), la cual puede interactuar con las células del hospedero y que junto con vp19 y vp24 forman otro complejo proteico (Li et al., 2012). Su presencia o ausencia indicaría la diferencia en la mortalidad y tiempo de muerte del hospedero como vimos en este trabajo.

En otros estudios se evaluó la interacción de estas proteínas, con la proteína de unión a quitina de *P. monodon* (PmCBP), encontrando que vp24, vp31, vp32, vp39B, vp53A, vp56, vp41A, vp53B, vp51B, vp110 y vp124 eran las proteínas que interactúan con PmCBP, se identificó que Vp41A mantiene una fuerte relación con PmCBP (Huang et al., 2013). Mientras que vp28 interactúa con PmRab7(Tuan, 2016.), y vp187 se une a β -integrina (Lee and Chen, 2017). Lo que podría explicar la mortalidad del 100%, debido a que los aislados no contaban con vp41A.

La delección de la proteína de envoltura vp41A, no permite la formación del complejo proteico compuesto por vp26, vp28 y vp56. Lo que podría ser perjudicial en su patogenicidad y virulencia, pero debido a la interacción de vp41A con CBP, esto le podría representar una ventaja para no ser reconocido a tiempo por el hospedero, por lo que los aislados de 2008 y angostura mantiene su virulencia y mortandad del 100%, en comparación con el aislado del CIAD, pero como este último no pudo ser secuenciado no será posible realizar la comparación de vp41A.

En relación con la respuesta inmune innata del camarón, se ha identificado que dos proteínas de envoltura, vp36 y vp41B. Actúan sobre el mecanismo de apoptosis usado por el camarón, para el control de la carga viral. Encontrando que vp36 actúa como represor, mientras que vp41B activa la transcripción de PjCaspasa en *Marsopenaeus japonicus*, PjCaspasa actúa como efector en la apoptosis de células infectadas (Wang et al., 2008).

Debido a que también se presentó la delección de vp41B en el genoma de Angostura y 2008, esto podría representar otra ventaja del virus sobre el hospedero, debido a que no se desencadenaría la apoptosis de las células infectadas, permitiendo la replicación del virus. Esta podría ser una diferencia presente entre el genoma del CIAD y los de Angostura y 2008, debido a que este sistema de apoptosis es la encargada de controlar la carga viral en el hospedero (Zuo et al., 2011), cuestión que se resolverá cuando se tenga disponible la secuencia de la cepa CIAD.

7. CONCLUSIONES

En el estudio se encontraron diferencias entre los grados de virulencia de los aislados CIAD, 2008 y Angostura, lo que permitió categorizarlos con baja, media y alta virulencia respectivamente.

Existe una relación directa entre la carga viral en cada aislado y su grado de virulencia.

, Las delecciones identificadas en los aislados de 2008 y Angostura son WSV 234, WSV 237 (vp41A), WSV 238 (vp52A), WSV 242 (vp41B), WSV244, WSV 247, WSV463 a, WSV463 b, WSV 463 c, WSV 463 d, WSV 489, WSV 490, WSV 492, WSV 493 (vp35) y WSV 495.

El aislado de Angostura y 2008 presentan mayor similitud filogenética al aislado mexicano anteriormente secuenciado que también corresponde a un brote de WSSV en sonora en el año 2008.

Los aislados del 2008 y Angostura no presentan gran diferencia en sus tamaños, y se situaron entre los genomas más pequeños reportados del WSSV. Sin embargo, al comparar los ORF 75, 94 y 125 con los genomas del WSSV del GenBank se observó que ORF 75 tiene una menor diferencia en el porcentaje de similitud con la mayoría de los genomas, excepto con el genoma de México (100%) y manteniendo una similitud del 99.93% con los genomas aislados de China, Taiwán y Egipto. Por otra parte, el aislado del 2008, tuvo solo una diferencia en el porcentaje de similitud del ORF 75 con el genoma de Corea del Sur.

Esto podría deberse a que ORF 75 del aislado de Angostura es más grande que su homólogo del 2008, con una diferencia de 1293 pb entre ORFs, lo que aumenta su posibilidad de tener diferencias en sus nucleótidos con otros aislados.

Las mutaciones encontradas en las secuencias de los aislados podrían beneficiarlos al facilitarles la infección, ya que se sabe que algunas de sus deleciones interactúan con los sistemas de defensa del hospedero.

8. REFERENCIAS

- B., O., D., S.G., 2011. White Spot Syndrome Virus (WSSV) Concentrations in Crustacean Tissues – A Review of Data Relevant to Assess the Risk Associated with Commodity Trade. *Transbound. Emerg. Dis.* 58, 469–482. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01231.x>
- Bateman, K.S., Tew, I., French, C., Hicks, R.J., Martin, P., Munro, J., Stentiford, G.D., 2012. Susceptibility to infection and pathogenicity of White Spot Disease (WSD) in non-model crustacean host taxa from temperate regions. *J. Invertebr. Pathol.* <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.022>
- Chang, Y.-S., Liu, W.-J., Chou, T.-L., Lee, Y.-T., Lee, T.-L., Huang, W.-T., Kou, G.-H., Lo, C.-F., 2008. Characterization of White Spot Syndrome Virus Envelope Protein VP51A and Its Interaction with Viral Tegument Protein VP26. *J. Virol.* 82, 12555–12564. <https://doi.org/10.1128/JVI.01238-08>
- Durán-Avelar, M.D.J., Pérez-Enríquez, R., Zambrano-Zaragoza, J.F., Montoya-Rodríguez, L., Vázquez-Juárez, R., Vibanco-Pérez, N., 2015a. Genotyping WSSV isolates from northwestern Mexican shrimp farms affected by white spot disease outbreaks in 2010-2012. *Dis. Aquat. Organ.* <https://doi.org/10.3354/dao02844>
- Durán-Avelar, M.D.J., Pérez-Enríquez, R., Zambrano-Zaragoza, J.F., Montoya-Rodríguez, L., Vázquez-Juárez, R., Vibanco-Pérez, N., 2015b. Genotyping WSSV isolates from northwestern Mexican shrimp farms affected by white spot disease outbreaks in 2010-2012. *Dis. Aquat. Organ.* 114. <https://doi.org/10.3354/dao02844>
- Durand, S. V, Lightner, D. V, 2002. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *J. Fish Dis.* 25, 381–389. <https://doi.org/doi:10.1046/j.1365-2761.2002.00367.x>
- Europe, I., 2018. GLOBEFISH - Análisis e información comercial en pesquerías Farmed shrimp output increased by about 6 percent in 2017 4–7.
- Gao, M., Li, F., Xu, L., Zhu, X., 2014. White spot syndrome virus strains of different virulence induce distinct immune response in *Cherax quadricarinatus*. *Fish Shellfish Immunol.* 39, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.04.011>
- Hidayani, A.A., Tassakka, A.C.M.A.R., Parenrengi, A., 2016. Isolation and characterization of an envelope protein (VP19) of a white spot syndrome virus from diseased vannamei (*Litopenaeus vannamei*) in Indonesia. *AACL Bioflux.*
- Huang, P.-Y., Chen Pei-Jung, Huai-Ting, H., Li-Li, C., 2013. IDENTIFICATION AND ANALYSIS OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV) ENVELOPE PROTEIN VP41A. *J. Mar. Sci. Technol.* 21, 234–240. <https://doi.org/10.6119/JMST-013-1220-13>
- Jeyasekaran, G., Reddy, A.D., J Shakila, R., 2013. Morphogenesis, Pathogenesis, Detection and Transmission Risks of White Spot Syndrome Virus in Shrimps. *Fish. Aquac. J.* <https://doi.org/10.4172/2150-3508.1000066>

- Lan, Y., Lu, W., Xu, X., 2002. Genomic instability of prawn white spot bacilliform virus (WSBV) and its association to virus virulence. *Virus Res.* [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(02\)00231-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(02)00231-9)
- Leal Esparza, HM, Magallón Barajas, FJ, Pérez Enriquez, R, Casillas Hernández, R, Cabanillas Ramos, JA, Valenzuela Quiñónez, W., 2012. Región Endémica y Regímenes de infección con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en las granjas camaronícolas del noroeste de México. *Ra Ximhai* 8, 117–129.
- Lee, Y.J., Chen, L.L., 2017. WSSV envelope protein VP51B links structural protein complexes and may mediate virus infection. *J. Fish Dis.* <https://doi.org/10.1111/jfd.12538>
- Li, F., Gao, M., Xu, L., Yang, F., 2017a. Comparative genomic analysis of three white spot syndrome virus isolates of different virulence. *Virus Genes* 53, 249–258. <https://doi.org/10.1007/s11262-016-1421-z>
- Li, F., Yang, F., Gao, M., Xu, L., 2017b. Comparative genomic analysis of three white spot syndrome virus isolates of different virulence. *Virus Genes.*
- Li, Q., Chen, Y., Yang, F., 2004. Identification of a collagen-like protein gene from white spot syndrome virus. *Arch. Virol.* <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0221-7>
- Li, Q., Liu, Q.H., Huang, J., 2012. VP90 of white spot syndrome virus interacts with VP26 and VP28. *Acta Virol.* https://doi.org/10.4149/av_2012_01_57
- López de Heredia, U., 2016. Las técnicas de secuenciación masiva en el estudio de la diversidad biológica. *Munibe Ciencias Nat.* 64. <https://doi.org/10.21630/mcn.2016.64.07>
- Marks, H., 2005. Genomics and transcriptomics of white spot syndrome virus.
- Marks, H., Goldbach, R.W., Vlak, J.M., Van Hulten, M.C.W., 2004. Genetic variation among isolates of White spot syndrome virus. *Arch. Virol.* <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0248-9>
- Mejias, A.V., Peña, N., 2010. The White Spot Syndrome Virus (WSSV): a review and its impact on Costa Rican shrimp production.
- Morales, V., Cuéllar-Anjel, J., n.d. Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos.
- Pradeep, B., Rai, P., Mohan, S.A., Shekhar, M.S., Karunasagar, I., 2012. Biology, host range, pathogenesis and diagnosis of white spot syndrome virus. *Indian J. Virol.* 23, 161–174. <https://doi.org/10.1007/s13337-012-0079-y>
- Precauciones, P.Y., La, P., 2018. Amenazas y riesgos de la introducción de especies de camarones exóticas 1–18.
- Qiang Wan, □, Xu, L., Yang, F., 2008. VP26 of White Spot Syndrome Virus Functions as a Linker Protein between the Envelope and Nucleocapsid of Virions by Binding with VP51. *J. Virol.* 82, 12598–12601. <https://doi.org/10.1128/JVI.01732-08>
- Ramos, S., 2010. MECANISMOS DE INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA MANCHA

BLANCA (WSSV) EN CAMARÓN *Litopenaeus vannamei* EXPUESTO A SALINIDADES EXTREMAS. Univ. Auton. baja Calif. 97.

- SAGARPA, 2017. Avanza México como una potencia en producción acuícola 1–2.
- Sánchez-Paz, A., 2010. White spot syndrome virus: An overview on an emergent concern. Vet. Res. <https://doi.org/10.1051/vetres/2010015>
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Sun, Z., Li, S., Li, F., Xiang, J., 2014. Bioinformatic prediction of WSSV-host protein-protein interaction. Biomed Res. Int. <https://doi.org/10.1155/2014/416543>
- Tuan, V. Van, n.d. Antibacterial and antiviral activity of different haemocyte subpopulations of *Litopenaeus vannamei*.
- Verbruggen, B., Bickley, L.K., van Aerle, R., Bateman, K.S., Stentiford, G.D., Santos, E.M., Tyler, C.R., 2016. Molecular mechanisms of white spot syndrome virus infection and perspectives on treatments. Viruses. <https://doi.org/10.3390/v8010023>
- Wang, L., Zhi, B., Wu, W., Zhang, X., 2008. Requirement for shrimp caspase in apoptosis against virus infection. Dev. Comp. Immunol. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.10.010>
- Youtong, W., Deachamag, P., Phongdara, A., Chotigeat, W., 2011. WSSV: VP26 binding protein and its biological activity. Fish Shellfish Immunol. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.09.008>
- Zuo, H., Chen, C., Gao, Y., Lin, J., Jin, C., Wang, W., 2011. Regulation of shrimp PjCaspase promoter activity by WSSV VP38 and VP41B. Fish Shellfish Immunol. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.02.021>