



Filogenia de las proteínas estructurales del virus de la mancha blanca (WSSV) patógeno de *Litopenaeus spp.*

ZINNIA J. MOLINA GARZA*, LUCIO GALAVIZ SILVA*, JUAN MANUEL ALCOGER*, JOSÉ ROSALES E.*

En México existen 402 granjas (45 mil Ha) destinadas al cultivo de camarón,¹ ubicadas en Sonora, Sinaloa y Nayarit. Pero aunque el área sujeta a explotación ha mostrado un incremento superior a 90% en los últimos tres años, las epizootias por enfermedades virales han sido más severas, y frecuentemente causan elevadas mortalidades y la pérdida de las cosechas, ocasionando serios estragos en la industria.

Limitan la producción y expansión de la camaronicultura, que es el sustento de las poblaciones ejidales no aptas para la agricultura.¹ Sobresalen entre las patologías de mayor importancia en la acuicultura del camarón en el mundo, las ocasionadas por el virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV), por su capacidad de dispersión, amplio rango de hospederos y daños económicos. Se ha determinado la secuencia completa del genoma de WSSV, como DNA de doble cadena circular; la cual contiene 292,967 nucleótidos (número de acceso en el GenBank .AF369029) con 184 marcos de lectura abierta y consta, al menos, de cinco proteínas estructurales mayores, de las cuales VP28 y VP19 se asocian con la envoltura del virión, la VP 26, VP 24 y VP15 con la nucleocápside.²

Debido a las variantes genómicas de WSSV que se reportan en el ámbito internacional, se consideró importante determinar la secuencias nucleotídicas que codifican para las proteínas mayores: VP28,

VP26, VP19 y VP15, que forman parte de la estructura viral de WSSV, causante de las epizootias de cultivos mexicanos. Estas secuencias se compararon con las descritas en los bancos de genes para otros aislados de WSSV, lo que permitirá determinar el grado de homología y relación filogenética con los aislados norteamericanos y asiáticos.

Metodología

Sitios de colecta y transporte de muestras. Los sitios de colecta quedaron ubicados en las granjas Tenari, Patague y Cruz Blanca del estado de Sinaloa y en el estado de Nayarit en la Bahía de Matanchén.

Los organismos seleccionados se trasladaron en su mayoría vivos, con oxígeno suplementario, en bolsas de polietileno selladas y se procedió a la purificación viral.

Purificación viral. El WSSV fue purificado de camarones de *L. vannamei* naturalmente infectados, provenientes de las granjas camaronícolas. El homogeneizado consistió de 15 a 20 camarones sin cabeza y exoesqueleto y 400 ml de buffer TN (Tris 0.02M, NaCl 0.2M pH 7.4), centrifugándose a 15 000 rpm por 30 minutos a 4°C, de acuerdo al pro-

*Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.
correo: molinazinnia@hotmail.com

** Lab. Patología Molecular y Experimental, Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco.

toloco de Payment y Trudel (1993)³ y Wang *et al.*⁴ Al final, el purificado viral se resuspendió en TN 1% pH7.4 y se almacenó a -20°C para su uso posterior.

Ultraestructura de partículas virales. La presencia de partículas de WSSV en las bandas de sucrosa fue confirmada por MET, depositando 5 µl en una rejilla cubierta de collodion/carbón, la tinción negativa se realizó con ácido fosfotúngstico 2% (PTA).⁵ Para el examen de las muestras y las fotografías de las partículas se utilizó un microscopio electrónico de transmisión Hitachi HU 12C.

Purificación de los ácidos nucleicos: El ADN viral del purificado se trató con proteinasa K (0.2 mg/ml) 1 h a 45°C y sarcosil (a una concentración final de 1% a 70°C por 2 horas), seguido por una extracción con DNAzol®. La pastilla obtenida fue resuspendida en buffer TE 1 X (Tris-EDTA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH).

Reacción en cadena de la polimerasa (RCP). Los iniciadores se sintetizaron en el Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco, México. A partir de las secuencias nucleotídicas reportadas en el GenBank/EMBL y el descrito por Van Hulst *et al.*² El volumen de las reacciones fue de 50 µl con 5 µl del templado de ADN, 5 µl de amortiguador de PCR 10 X MgCl₂ (1.5 mM), desoxirribonucleótidos trifosfato (0.2 mM), 0.5 ml de Taq polimerasa (Expand High Fidelity PCR system, Roche®, Indianápolis, IN) y 100 pmol de cada iniciador. Las secuencias de los iniciadores fueron diseñadas con el programa Primer 5 y anillan en las siguientes coordenadas: para la vp28, entre el 96nt y 604nt; los iniciadores de la vp1, 5 entre 163936nt y 164246nt; vp26, entre 228258y 228826; y para la vp19 en la posición 2900003nt y 290365 nt.² El programa de amplificación fue (°C/min) de 94/4, 55/1, 72/3, (94/1, 55/1, 72/3) X 30, 72/5 y 4/∞. Los geles de agarosa fueron preparados a 1% en buffer de TBE (Tris-Borato EDTA) y teñidos con 0.5 g ml⁻¹ bromuro de etidio.⁶ El marcador de peso molecular fue 100 DNA ladder (Bioline®, Randolph, MA, USA).

Construcción de plásmido. Los fragmentos subgenómicos fueron clonados en el vector pMosBlue (Amersahm Pharmacia Biotech) y trans-

formados en células competentes *E. coli* DH5∞, usando las técnicas estándar.⁶ El DNA clonado fue digerido con *Eco* RI y *Hind* III (Roche Molecular Diagnostic).

Análisis filogenético. Después de la clonación de las proteínas estructurales del virus de la mancha blanca, se procedió a conocer la identidad, secuencias nucleotídicas y a efectuar el análisis proteómico de las proteínas que expresan las regiones de vp28, vp26, vp19 y vp15, con el programa SOSUI Mitaku Group Departamento of Biotechnology Tokyo University of Agricultura and Technology. La alineación múltiple de secuencias homólogas de aminoácidos y nucleótidos se realizó con el programa Clustal W 1.82⁷ y Blast (NCBI/SIB, Swiss Institute of Bioinformatics). El análisis filogenético se ejecutó con el programa MEGA 2.1⁸ (Phylogenetic and Molecular Evolutionary Analizes) y se comparó con el árbol filogenético del programa ClustalW. En ambos casos se usó el método NJ (Neighbour Joining) tipo *bootstrap* con 1000 réplicas, transiciones y transversiones, incluido en ambos programas.

Resultados

Los signos macroscópicos que presentaron los organismos fueron la apariencia general del cuerpo con una coloración rosada a rojiza (expansión de cromatóforos), letargia, pérdida de apetito, nado errático y permanencia en la orilla del estanque. A diferencia de los países asiáticos, no presentaron las manchas blancas en el exoesqueleto.

Ultraestructura de partículas virales por MET

Seleccionadas las muestras positivas, se procedió a la purificación viral. En los gradientes discontinuos entre el 40 y 15% se obtuvo una y en la de los continuos se obtuvieron dos bandas, una entre la de 40 y 30% y otra en la de 20 y 10%, posteriormente se procedió a la última ultracentrifugación y se obtuvo la purificación viral y la confirmación de su morfología por MET.

Los virus completos se observaron en forma de bastón, con una extensión apical en el extremo que va desde talla muy corta de 60 nm a una larga de 240 nm. La nucleocápside se observó en diferentes

formas, con la envoltura llega a medir de 60 a 396nm y sin ésta 50 x 133.3nm, con apariencia superficialmente segmentada. El número de estriaciones varía de 10 a 15nm (figura1).

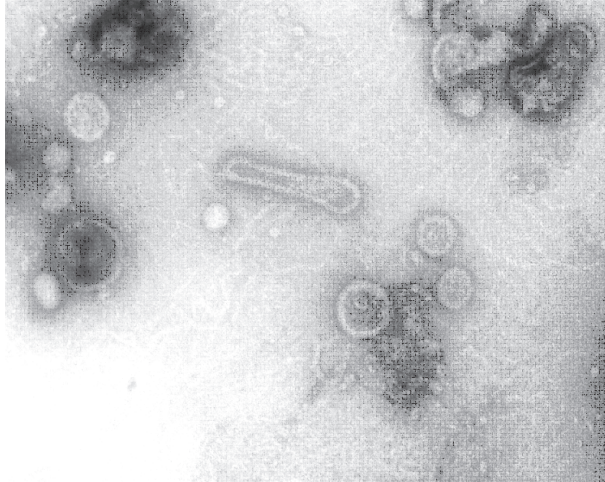


Fig. 1. Micrografía de purificados virales. Partículas virales con tinción negativa obtenidas en gradientes de sucrosa, observándose viriones completos con ambos extremos cerrados. Tinción con PTA a 2 %. (100nm). Determinación de las secuencias nucleotídicas que codifican para las proteínas mayores VP28, VP26, VP19 y VP15 que forman parte de la estructura viral.

Clonación de los marcos de lectura abierta con el vector pMOS-Blue

Los productos de PCR se clonaron en el vector pMOS-Blue, obteniéndose los plásmidos pMOS-VP28, pMOS-VP26, pMOS-VP19 y pMOS-VP15, los cuales fueron utilizados para la amplificación de los marcos de lectura abierta, la secuenciación nucleotídica, comparación y determinación de la homología con las descritas en los bancos de genes.

La búsqueda en bancos de datos reveló la presencia de varias secuencias similares a los fragmentos de VP15, VP 19, VP 26 y VP28, todas éstas perteneciente al virus WSSV de diferentes regiones geográficas. Estas secuencias se alinearon y se compararon utilizando el programa Clustal W.

Análisis filogenético del gen vp15

El análisis filogenético de los resultados obtenidos por Clustal W indica las secuencias forman tres distintos de *clusters*. Uno con el aislado de México que tiene una relación filogenética cercana al de

Taiwán, posiblemente con un ancestro común y el segundo grupo con el de China 95 e Indonesia, que forman un grupo diferente, pero ambos parten también de un ancestro común. En cambio, China1 probablemente tuvo una evolución aparte de los dos grupos citados (figura2).

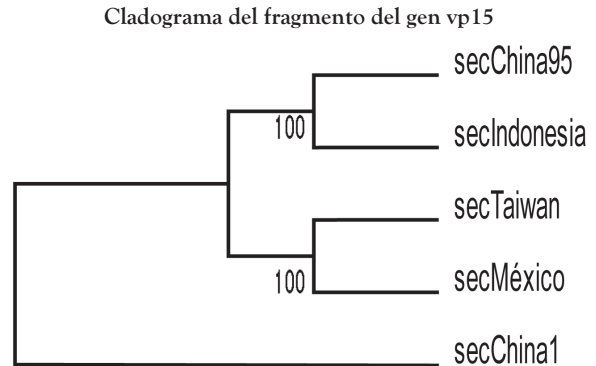


Fig. 2. Árbol filogenético generado con los datos obtenidos de la comparación Clustal W, para el gen de la VP15 de WSSV, México: 0.00396 (Indonesia: 0.00415, China1:0.01650:0.00734): 0.00396, Taiwán:0.00396, China95:0.01411. Los números sobre la rama indican el valor del *bootstrap* después de las 1000 réplicas/1000 remuestreos).

Análisis filogenético del gene vp28

El análisis filogenético N-J, Kimura-2, con 1000 repeticiones y 500 remuestreos, ubica un subgrupo donde se asocia a México y China, dentro del grupo de Taiwán, Tailandia, Japón, US98/South Carolina, Korea y China 95/Dalian (los detalles mayores se aprecian en la figura 3) con la misma rama evolutiva y niveles de bootstrap de 71-99% que se considera confiable. Las secuencias con 99% de homología (China95/Dalian; KoreaAF380842 y ChinaAF502435) se ubican en el mismo *cluster* de México, en cambio, para la secuencia de India, con 99% de homología, se obtuvieron resultados de un ancestro evolutivo diferente.

Análisis filogenético de secuencias del gene vp26

Las secuencias analizadas con MEGA agrupan dos *clusters* principales, el mayor de ellos ubica a México, pronostica una rama evolutiva muy relacionada con los aislados de China/Dalian, India, Indonesia, US96/SCarolina y otros sin referencia geográfica que se muestran en la figura 4.

Cladograma del fragmento del gene vp28

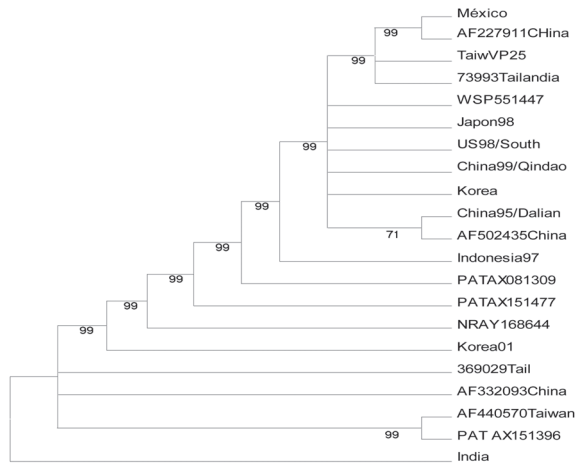


Fig. 3. Árbol filogenético de las secuencias homólogas a VP28 del aislado mexicano. Análisis con el modelo NJ, Kimura-2 (1000 repeticiones y 500 remuestros, transiciones+transversiones) con el programa MEGA.

Cladograma de vp26

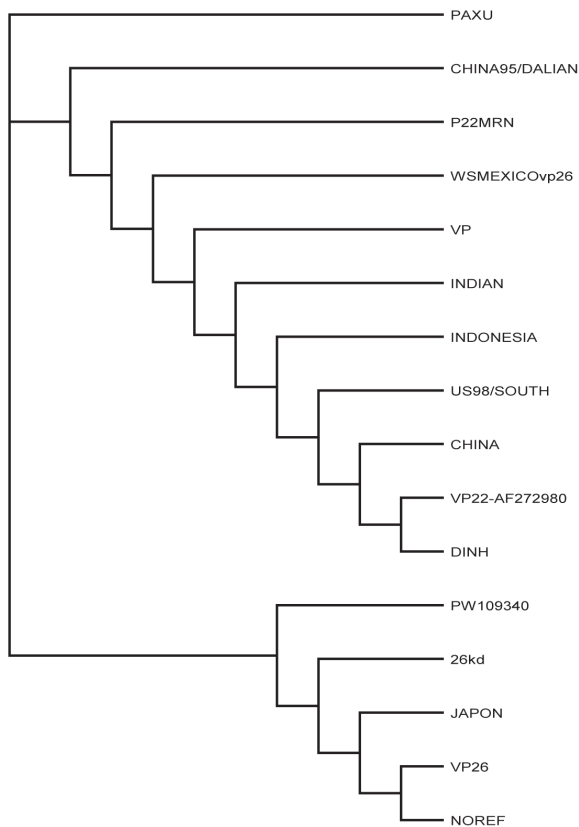


Fig. 4. Árbol filogenético de vp26. La predicción evolutiva con el método *bootstrap* predice tres ramas evolutivas. La secuencia del aislado mexicano se relaciona filogenéticamente con los aislados de China, India, Indonesia y US98/South Carolina.

Análisis filogenético de secuencias del gene vp 19

El análisis tipo *bootstrap*, con 1000 reposiciones, no predice una asociación evolutiva confiable, mostrada por los valores bajos entre el 14 al 23 de frecuencia estadística. Éste se analizó hasta 24500 resiembras sin resultados satisfactorios. El programa MEGA predice únicamente una rama evolutiva separada para India, y el resto asociado en dos grupos mayores, según se describe con detalle en la figura.⁵

Cladograma del gene vp 19

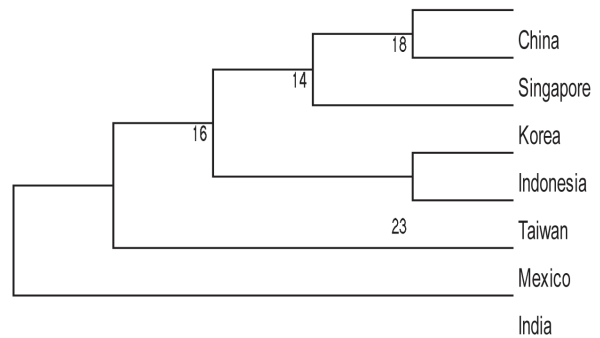


Fig. 5. Árbol filogenético de las secuencias homólogas a vp 19, de acuerdo a la predicción del programa MEGA, basado en el tipo de análisis *bootstrap* con 1000 repeticiones.

Discusión

El WSSV es un virus devastador que afecta a un amplio número de hospederos acuáticos, particularmente camarones peneidos. Hasta ahora se ha comprobado que el virus de WSSV tiene un genoma de 305 kb,² y en un análisis de éste reportan 181 marcos de lectura abierta (ORFs), donde algunos ORF's son similares a genes virales y otros a genes eucarióticos, pero la mayoría codifica a proteínas putativas sin homología a alguna proteína conocida.⁹ Por tanto, proponen una nueva familia *Nimaviridae* y un nuevo género *Whispovirus*, reconocido por el Comité Internacional de Taxonomía Viral.¹⁰

Con base en estos datos, y por ser un patógeno de efectos devastadores en México, se propuso purificar y caracterizar al WSSV, enfocándonos a las proteínas que conforman la cápside y nucleocápside, por PCR, clonar los marcos de lectura abierta (no

se muestra aquí) y realizar un análisis de homología filogenético de virus. En los resultados obtenidos por MET en tinción negativa se observó la nucleocápside en diferentes formas (debido a la morfogénesis del virus de WSSV). Cuando la nucleocápside está totalmente formada, en un extremo se observa la forma de aro o anillo, con una prolongación en forma de tubo en la cual están localizados los cores en arreglos paralelos, reflejando una segmentación superficial, cubiertos por una membrana. El tamaño de la nucleocápside es de los más grandes reportados en las cepas estudiadas a la actualidad, comparados con los descritos por Nadala *et al.*¹¹ quienes describen el virus con 14 a 15 estriaciones verticales conspicuas localizadas periódicamente a lo largo del axis del core y su forma viral es de bastón con una longitud de 130 a 159 nm. Durand *et al.*¹² reportan la nucleocápside con extremos asimétricos: uno redondo y otro en forma cuadrada, con una apariencia superficialmente segmentada. La descripción viral antes mencionada es similar a la observada en los camarones infectados naturalmente del Pacífico mexicano.

En lo que respecta a los marcos de lectura abierta, se obtuvieron cuatro de los cinco genes descritos por Van Hulst *et al.*² vp28, vp26, vp19 y vp15, a los cuales se les considera importantes en cuanto al daño patológico que causan al camarón. Si se compara la evolución de los genes asiáticos con los mexicanos, se puede asumir que también evolucionaron de un gen que se duplicó y luego se separaron, en estas mismas proteínas, tuvieron funciones diferentes en el virus de WSSV, y fueron asignados a diez familias de genes,¹³⁻¹⁵ lo que es posible; ya que los eventos de duplicación de genes pueden ser tanto en virus que presenten genoma de RNA,¹⁶ como en virus de DNA muy largo, estos tipos de virus pueden jugar un papel muy importante en la coevolución entre el virus y el hospedero en respuesta a la presión selectiva.¹⁷

En total, la bibliografía utilizada describe cinco proteínas de la envoltura viral, cuyos genes se presentan como copias simples en el genoma¹⁸ que han sido identificadas: VP28, VP26/P22, VP19, VP466 y VP281^{15,19} todas de importancia en los mecanismos de infección viral, sobresaliendo la VP28. De las mencionadas anteriormente, se obtuvieron los

marcos de lectura abierta: vp15, vp19, vp26 y vp28, en los que se realizó un análisis de homología y alineación múltiple de las secuencias reportadas en el GenBank de diferentes regiones geográficas, estas secuencias se alinearon y se compararon utilizando el programa Clustal W.

Para el gen vp15, el análisis de esta comparación mostró que existen diferencias en donde se sustituyen uno o dos nucleótidos, obteniendo tres distintos *clusters*: uno con el aislado de México que tiene una relación filogenética cercana a Taiwán con 100% de homología, en los otros dos grupos tuvo una homología de 99%: China95 e Indonesia formando un grupo, y China1 probablemente tuvo una evolución aparte de los dos grupos; los tres se originaron de un ancestro común. Para la vp28 se localizaron secuencias similares pertenecientes al virus de WSSV de diferentes regiones geográficas, empleando el programa Blast (EMBL), observándose que el aislado mexicano presenta una homología de 100% con los aislados de Vietnam, Korea, EUA 98/Sur Carolina, Indonesia, China 99/Qindao, Taiwán, Tailandia, China, China95/Dalian, Korea; con 99% de homología se presenta la India debido a que existen diferencias en donde se sustituyen 1 o 2 nucleótidos, formando un grupo evolutivo diferente. Para la vp26 se encontraron varias secuencias similares al aislado mexicano de WSSV, la mayoría con una homología de 100%, en el análisis Clustal W, en general predice tres grupos con valores bajos en el *bootstrap*, indicando una confianza estadística escasamente informativa. Para el gen vp19 se observaron tres grupos diferentes con sustituciones en dos nucleótidos, formando tres grupos: uno el de la India, otro el de Singapur, China y Korea, el aislado mexicano se localiza con Taiwán e Indonesia con 100% de homología. En general, todos proceden filogenéticamente de un ancestro común y se van formando grupos, el aislado mexicano en los reportes coincide en un 100% de homología con Taiwán y US98/South Carolina y con los demás aislados geográficos, en general, en 99% de homología.

Los esfuerzos a nivel internacional son enormes por las epizootias masivas en Asia y América, y se dirigen hacia el diseño de herramientas diagnósticas certeras y evaluación de proteínas virales como

inmunoprotectores, a pesar de que el camarón no posee la capacidad de "memoria inmunológica".²

Resumen

El cultivo camarón es el sustento de poblaciones costeras. A partir de 1999 las pérdidas causadas por WSSV, el patógeno más severo, llegaron a 90 y 100%. Debido a las variantes genómicas reportadas en Asia y América, los objetivos fueron determinar la secuencias nucleotídicas que codifican para las proteínas estructurales mayores VP28, VP26, VP19 y VP15, para determinar el grado de homología y la relación filogenética del aislado mexicano con las del GenBank/EML. El aislado mexicano presentó un 100% homología con Taiwán y US98/SouthCarolina, con los aislados de otras regiones geográficas mostró 99% de homología o menos. Estos datos permitirán la elección correcta de antígenos recombinantes en el diseño de vacunas específicas para prevenir la infección por WSSV.

Palabras clave: Virus del síndrome de la mancha blanca, WSSV, *Litopenaeus*, Cultivo de camarón.

Abstract

The livelihood of human coastal population is the shrimp culture. WSSV is currently the most serious viral pathogen. Since 1999, it has caused up to 90-100% mortality in Mexican shrimp farms. Our objectives were to determine the nucleotide sequences encoding of major structural proteins VP28, VP26, VP19, and VP15 to see the similarity and phylogenetic analyses between the isolated WSSV-Mexican and the updated Gene Bank/EML. Pairwise comparisons showed no difference between isolated Mexican-WSSV and Taiwan and US98/SouthCarolina. With the other geographic isolates, it showed a 99% or lower sequence similarity.

Keywords: White spot syndrome virus, WSSV, *Litopenaeus*, Shrimp culture.

Referencias

1. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Social, Pesca y Alimentación 2003. Anuario Estadístico de Pesca 2001. SAGARPA. México.
2. Van Hulten M C W, J Witteveldt, S Peters, N Kloosterboer, R Tarchini, M Fiers, H Sandbrink, R K Lankhorst, J M Vlak. 2001. The White Spot Syndrome Virus DNA Genome Sequence. *Virology* 286, 7-22.
3. Payment P. and M Trudel. 1993. *Methods and Techniques in Virology* Marcel Dekker, Inc. pps.309
4. Wang C.H., C.F. Lo, J.H. Leu, C.M. Chou, P.Y. Yeh, H.Y. Chou, M.C. Tung, C.F. Chang, M.S. Su, G.H. Kou. 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Disease of Aquatic Organisms* 23:239-242.
5. Alain R., P. Berthiaume. 1993. Immunocytochemical Staining in Electron Microscopy. In: Payment, PJ; M Trudel (Eds). *Methods and Techniques in Virology*. Chap 18. Marcel Dekker, Inc. NY, pp. 167.
6. Sambrook J., D. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Volume 1, Third Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N. Y.
7. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680.
8. Kumar S., Tamura K., I. Jakobsen, Nei M. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
9. Yang F., J. He, X. Lin, Q. Li, D. Pan, X. Zhang, X. Xu. 2001. Complete Genome Sequence of the Shrimp White Spot Bacilliform Virus. *Journal of Virology*. 11811-11820.
10. Vlak J.M., J.R. Bonami, T.W. Flegel, G.H. Kou, D.V. Lightner, C.F. Lo, P.C. Loh, P.J. Walker. 2002. A report in XII the International Congress of Virology, Paris.
11. Nadala C.B., L.M. Tapay, P.C. Loh. 1998. Characterization of a non-occluded baculovirus-

- like agent pathogenic to penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*. Vol.33:221-229,1998.
12. Durand S., D.V. Lightner, R.M. Redman, J.R. Bonami. 1997. Ultrastructure and morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organism*. Vol. 29:205-211.
 13. Van Hulst M.C.W., T.M. Feng, Ch.A. Schipper, L.Ch. Fang, K.G. Hsiung, J.M. Vlak. 2000. Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions. *Journal of General Virology*. 81, 307-316.
 14. Van Hulst M.C.W., J. Witteveldt, M. Snippe, J.M. Vlak. 2001. White Spot Syndrome Virus Envelope Protein VP28 is Involved in the Systemic Infection of Shrimp. *Virology* 285, 228-233.
 15. Van Hulst M.C.W., M. Reijns, A.M.G. Vermeesch, F. Zandbergen, J.M. Vlak. 2002. Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins. *Journal of General Virology* 83,257-265.
 16. Boyko V.P., A.V. Karasev, A. Agranovsky, E.V. Koonin, V.V. Dolja. 1992. Coat protein gene duplication in a filamentous RNA virus of plants. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA* 89, 9156-9160.
 17. Davison A. 1999. What sequence homology tells us about the functions and origins of viral genes. *Microbiology Today* 26, 160-161.
 18. Marks H., M. Mennens, J.M. Vlak, M.C. W van Hulst. 2003. Transcriptional analysis of the white spot syndrome virus major virion protein genes. *Journal of General Virology*. 84,1517-1523.
 19. Huang C., X. Zhang, Q. Lin, X. Xun, Ch.L. Hew. 2002. Characterization of a novel envelope protein (VP281) of shrimp white spot syndrome virus by mass spectrometry. *Journal of General Virology*.83,2385-2392.

Recibido: 15 de abril de 2007
Aceptado: 15 de mayo de 2007