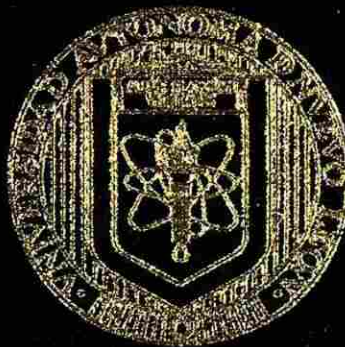


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



CLONACION Y CARACTERIZACION MOLECULAR DE LAS
PROTEINAS ESTRUCTURALES MAYORES (VP15, VP19, VP26 y
VP28) DEL VIRUS DEL SINDROME DE LA MANCHA BLANCA
(*White Spot Syndrome Virus*, *Nimaviridae*), PATOGENO DE *Litopenaeus* spp.
CULTIVADO EN GRANJAS DEL PACIFICO MEXICANO.

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESPECIALIDAD EN SANIDAD ACUICOLA

PRESENTA

M.C. ZINNIA JUDITH MOLINA GARZA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.

JULIO DE 2004

extremo que va desde talla muy corta de 60 nm a una larga de 240 nm, (Fig. 3). La nucleocápside se observó en diferentes formas, con envoltura llega a medir de 60 a 396nm y sin ella 50 x 133.3nm, con apariencia superficialmente segmentada. El número de estriaciones varía de 10 a 15nm. En varias ocasiones se observaron estructuras en forma de barril sin tallo o extensión, que parecen cápsides vacías o con material granular que podría ser DNA, las cuales llegaron a medir desde una longitud de 45nm hasta 200nm y diámetro 26 a 40nm (No se muestra).

Tabla IV

Análisis descriptivos de la nucleocápside (vacía), cápside, tallo y lámina de la nucleocápside.

ESTRUCTURA VIRAL (Forma de barril)	N	MINIMA	MAXIMA	MEDIA	DESVIACION ESTANDARD
NUCLEOCAPSIDE VACIA LONGITUD	20	60.00	396.00	150.0200	88.2904
NUCLEOCAPSIDE VACIA DIAMETRO.	20	13.30	40.00	23.8350	8.1570

ESTRUCTURA VIRAL	N	MINIMA	MAXIMA	MEDIA	DESVIACION ESTANDARD
CAPSIDE	6	26.60	93.30	63.5167	23.8880
TALLO	6	26.60	240.00	06.65	79.1241

ESTRUCTURA VIRAL (Forma anillo con prolongación)	N	MINIMA	MAXIMA	MEDIA	DESVIACION ESTANDARD
LONG LAMINAR. NUCLEOCAPSIDE	15	124.00	364.00	207.9733	74.7945
DIAM.LAMINAR NUCLOEOCPASIDE	15	28.00	50.00	39.4095	6.9226

También se encontró a la nucleocápside en forma inmadura, más que forma de bastón es de forma ovoide que llega a medir desde 26.6 nm a 93.3 nm, además de una prolongación o cola de 20 nm a 70 nm con el DNA en la parte central de la nucleocápside o en el margen de la nucleocápside (Fig. 4). Se observa también estructuras en forma de tubos largos, generalmente con estriaciones, abiertos de ambos extremos, con una longitud variable de 70 hasta 300 nm y diámetro 15 a 21 nm (estas medidas corresponden a la anchura máxima del tubo).



Fig. 3. Micrografía electrónica de transmisión (MET) tomada bajo tinción negativa en muestras de purificados virales la barra de escala es de 100nm, obtenidos en gradientes de sucrosa, en la cual nos muestra a los viriones completos de 60-396nm, se observa una extensión apical que va desde 60 nm a 240 nm.

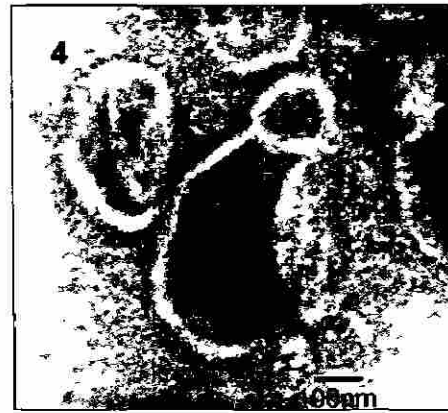


Fig. 4. MET de los purificados de WSSV en tinción negativa: Virion en forma ovoide con un diámetro variable que oscila desde 26.6 nm hasta 93.3 nm, además de una prolongación o cola de 20 nm a 70nm.

En secciones longitudinales se observan espacios a lo largo del tubo, y pequeños segmentos localizados periódicamente a la largo del axis con una longitud de 8 a 10nm en diámetro. La segmentación de estos tubos largos podrían ser los precursores de la nucleocápside (Fig. 5 a y b). En general la forma de la nucleocápside madura o completa presenta un extremo redondeado con apariencia de aro o anillo, que continúa en un tubo largo segmentado que termina generalmente cerrado; la longitud total es de 120 a 200 nm (desde el anillo a todo lo largo del tubo). El anillo presenta un diámetro de 15 a 30nm (Fig. 6).

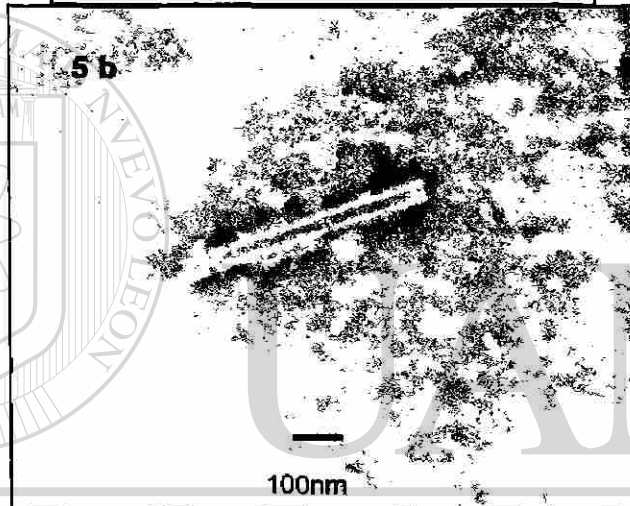
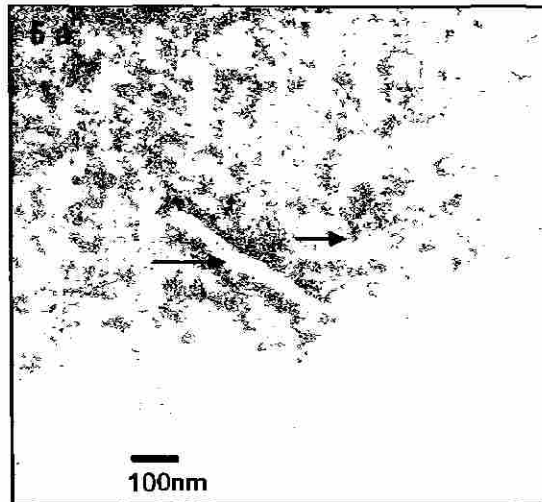


Fig. 5. Micrografía de partículas virales de WSSV con tinción negativa. 5a) Observación de tubos precursores de la nucleocápside (flechas) que llegan a medir 70 hasta 300 nm de largo por 15 a 21 nm de diámetro. 5b) Acercamiento a las segmentaciones transversales de los túbulos. Tinción con PTA al 2 %.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

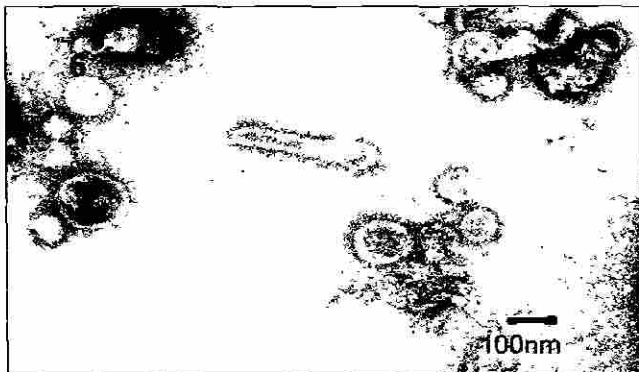


Fig. 6 Micrografía de purificados virales. Partículas virales con tinción negativa obtenidas en gradientes de sucrosa, observándose viriones completos con ambos extremos cerrados. Tinción con PTA al 2 %.

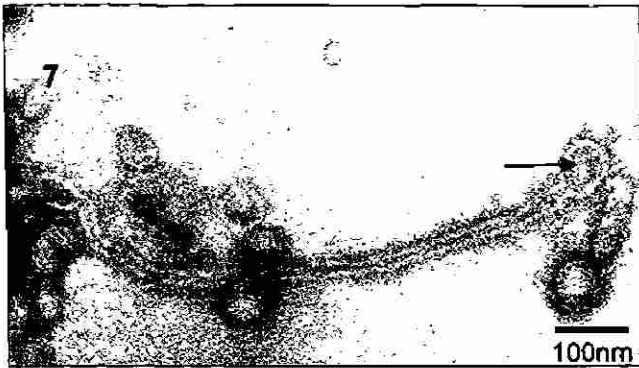


Fig. 7. Observación al MET de partículas con tinción negativa. Purificados virales de WSSV en gradientes de sucrosa: Observación de la nucleocápside con ambos extremos ovalados, unidos por un tubo largo de 124 nm a 364 nm de longitud.

Además se observaron unas estructuras en forma de nucleocápsides completas o maduras pero con ambos extremos redondos o forma de anillos unidos por el mismo tubo con una longitud de 124 nm hasta 364 nm y un diámetro de cada anillo de 24 a 36 nm (Fig. 7).

5. Ultraestructura del virus en tejido branquial

En el estudio ultraestructural por microscopía electrónica, los viriones completos, ovales a cilíndricos, son intranucleares; las partículas maduras tienden a concentrarse a lo largo del margen nuclear y los inmaduros en el centro, con un promedio en talla de 172.61 por 70.23 nm. La envoltura mide 12.85 nm de ancho y se observa trilaminar. El área de la nucleocápside y membrana varía mucho. La nucleocápside con forma cilíndrica mide en promedio de 167.85 x 49.28 nm, con un espesor de 6.90 nm de la pared externa. El core de la nucleocápside es altamente electrodensos. Algunos viriones, en corte longitudinal, presentan una proyección en uno de los extremos, como el que muestra la punta de flecha en la Fig. 8.

6. Proteínas del purificado viral analizados por SDS-PAGE: Al analizar por SDS-PAGE a las proteínas que constituyen a las estructuras virales, se identificaron cuatro proteínas mayoritarias que coinciden con el peso molecular de las reportadas para WSSV. El peso molecular de estas fue de 28, 26, 19 y 15 kDa (Fig. 9a y Tabla V), mientras que en las muestras de *L. vannamei* y *L. stylirostris* (muestra de control negativo, no infectado con WSSV), se observó una banda de proteína de 70 kDa únicamente (Fig. 9b, Tabla VI).

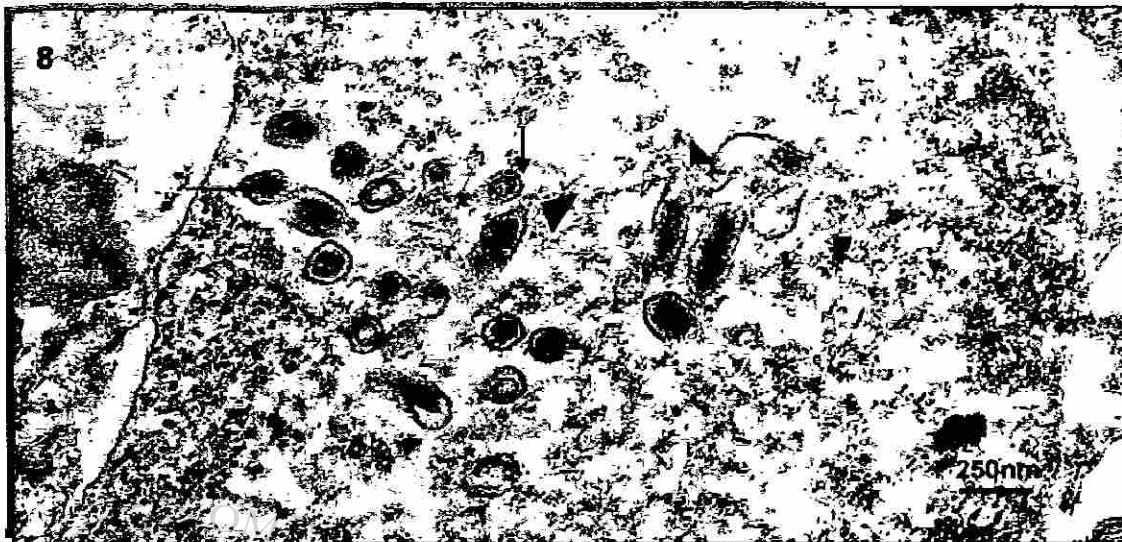


Fig. 8. Ultraestructura de tejido branquial infectado con WSSV. Sección longitudinal de viriones de WSSV localizados en el centro y periferia del núcleo, mostrando los virus en forma de varilla, con envoltura, de 258 a 300 nm. Las flechas indican el corte transversal del virus, mostrando la envoltura y la nucleocápside electrodensa. La proyección de la envoltura en uno de los extremos se indica con la punta de flecha. Tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo 12,000X.

Tabla V

Distancia recorrida por las proteínas en cm Movilidad relativa y peso molecular de las proteínas virales observadas en el gel de poliacrilamida al 12%.

CARRIL 1 : Mr FC:6.3		
DISTANCIA (cm)	Rf	PM (kDa)
0.3	0.0476	200.0
1.2	0.1904	97.4
2.35	0.3730	68.0
3.4	0.5396	43.0
4.4	0.6984	29.0
5.4	0.8571	18.4
5.8	0.9206	14.3
CARRILES 2,3,4 Y 5 PROTEÍNAS DEL PURIFICADO VIRAL DE WSSV.		
DISTANCIA (cm)	Rf	PM (kDa)
4.55	0.7222	28.50
4.75	0.7539	26.17
5.35	0.8492	18.99
5.65	0.8968	15.42

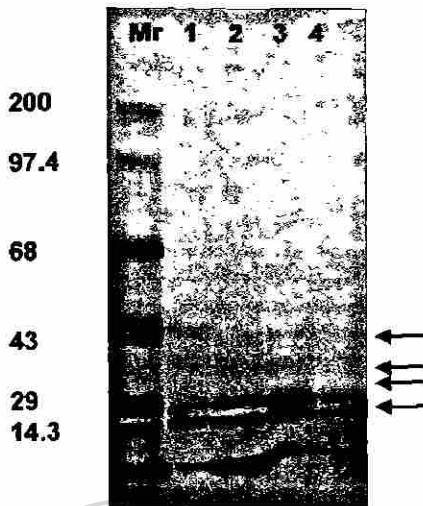


Fig. 9a. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los purificados virales de WSSV. Mr. Marcador de alto peso molecular carriles 1, 2, 3 y 4: Obtención de proteínas estructurales del virus de WSSV a partir del purificado de las muestras Dorado, la Angostura y Costa Rica respectivamente. La posición de las bandas de la VP28, VP26, VP19 y VP15 se señala con las flechas. Gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% teñido con Azul Coomassie.

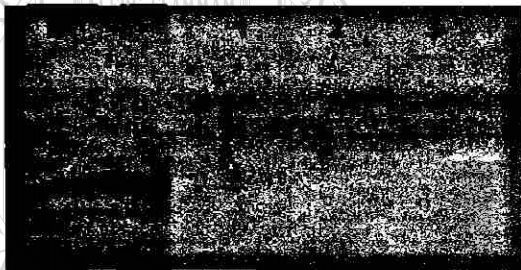


Fig. 9b. Electroforesis en gel de poliacrilamida de muestras no infectadas con el WSSV. Mr. Marcador de peso molecular. Carriles 1, 2 y 3: proteína aislada de camarones libres del WSSV de aprox. 70 kDa teñidas con Azul Coomassie.

Tabla VI

Distancia recorrida por las proteínas en cm movilidad relativa y peso molecular de la proteína del camarón sano en el gel de poliacrilamida al 12 %.

CARRIL 1: PM FC:6.3		
DISTANCIA (cm)	Rf	PM (kDa)
0.3	0.0476	200.0
1.2	0.1904	97.4
2.35	0.3730	68.0
3.4	0.5396	43.0
4.4	0.6984	29.0
5.4	0.8571	18.4
5.8	0.9206	14.3
CARRILES 2 Y 3 PROTEINA AISLADA DE CAMARONES SANOS		
DISTANCIA (cm)	Rf	PM (kDa)
1.08	0.1716	70.0

7. Western Blot

Con el fin de determinar la respuesta inmune humoral que se generó contra la inoculación de partículas virales en el modelo de ratón, las preparaciones virales se separaron por SDS-PAGE y posteriormente las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, las cuales se incubaron con el suero inmune. Este suero fue capaz de reconocer a las proteínas VP28, VP26 y VP15 (Fig. 10). El reconocimiento fue mayor para la proteína VP28, intermedio para la VP15 y bajo para la VP26. Este antisuero no reconoció a las proteínas VP24 y VP19.

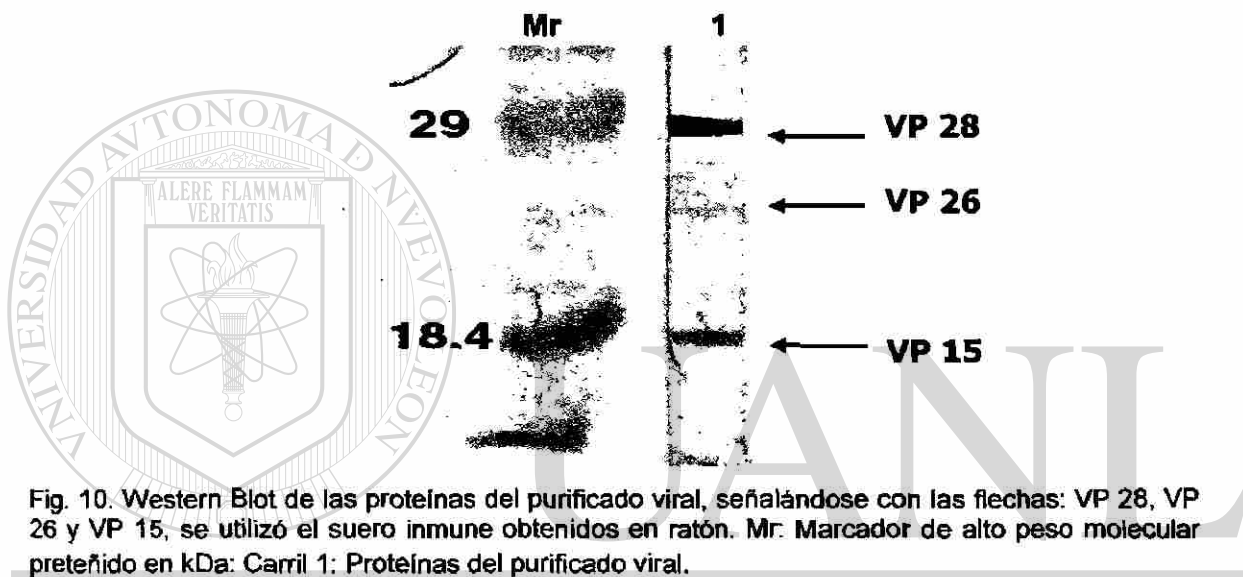


Fig. 10. Western Blot de las proteínas del purificado viral, señalándose con las flechas: VP 28, VP 26 y VP 15, se utilizó el suero inmune obtenidos en ratón. Mr: Marcador de alto peso molecular preteñido en kDa: Carril 1: Proteínas del purificado viral.

8. Amplificación de los marcos de lectura abierta (ORF's)

Posterior a la síntesis de los iniciadores específicos de los ORF's de la envoltura y cápside del virus, se procedió a la amplificación de las regiones genómicas que codifican para las proteínas de la cápside y la envoltura utilizando el DNA viral. Los productos amplificados por PCR se analizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Con los oligonucleotidos diseñados se amplificaron fragmentos de DNA correspondientes a los genes para las proteínas VP 28 (509 pb), que forma parte de la envoltura al igual que la VP 19 (363 pb), VP 26 (569 pb), VP 24 (585 pb) y VP 15 (311 pb), las cuales forman parte de la nucleocápside. Cabe señalar que en muestras de cuatro localidades de colecta se amplificaron los cinco ORF's correspondientes a las proteínas descritas. (Fig.

11). Para la región genómica de la VP 15 se obtuvo también el producto esperado de 311pb (Fig.12).

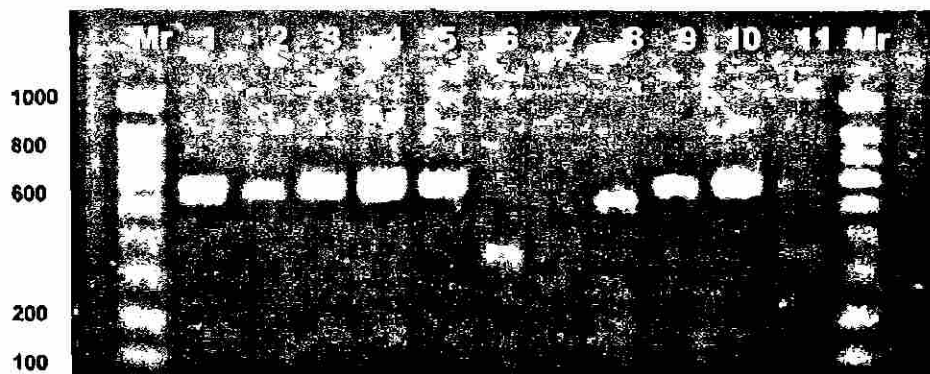


Fig. 11. Productos amplificados por PCR de las regiones genómicas que codifican para las proteínas de la cápside y de la envoltura utilizando DNA extraído de los purificados de WSSV de las localidades de muestreo descritas. Mr. Marcador Hyper ladder IV.1 Carriles 1 y 2) amplicones correspondientes de la VP 26; Carriles 3, 4 y 5) VP 24. Carril 6) VP 19. Carril 7) vacío. Carril 8) VP 28. Carril 9) VP 26. Carril 10) VP 24 y Carril 11) VP 19. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.



Fig. 12. Amplificación de los marcos de lectura abierta para las proteínas estructurales mayores del virus de WSSV. VP 28 (Carril 1; 509 pb), VP 26 (Carril 2; 569 pb), VP 24 (Carril 3; 585 pb), VP 19 (Carril 4; 363 pb) y VP 15 (Carril 5; 311 pb). Mr indica el marcador de pares de bases. Gel de agarosa al 1 % en TBE, teñido con bromuro de etidio.

Estos cinco productos de PCR fueron utilizados para clonación y expresión de la proteína y posteriormente, para la secuenciación nucleotídica, comparación y determinación de la homología con las descritas en los bancos de genes.

9. Secuencia esperada de los ORF

La secuencia esperada de los productos amplificados, sitios de anillamiento de los oligonucleotidos (en negritas) y posición (como se observó en la Fig. 11 y 12) de acuerdo a la secuencia de WSSV del GenBank, No. de acceso AF 369029 (van Hulten y cols., 2001), se presenta a continuación:

vp28: Tamaño esperado del producto de PCR en 509 pb.

**96 nt - tgt gac caa gac cat cga aac cca cac aga caa tat cga gac aaa cat gga tga
aaa cct ccg ca tcc tgt gac tgc tga ggt tgg atc agg cta ctt caa gat gac tga tgt gtc ctt
tga cag cga cac ctt ggg caa aat caa gat ccg caa tgg aaa gtc tga tgc aca gat gaa
gga aga aga tgc gga tct tgt cat cac tcc cgt gga ggg ccg agc act cga agt gac tgt
ggg gca gaa tct cac ctt tga ggg aac att caa ggt gtg gaa caa cac atc aag aaa gat
caa cat cac tgg tat gca gat ggt gcc aaa gat taa ccc atc aaa ggc ctt tgt cgg tag ctc
caa cac ctc ctc ctt cac ccc cgt ctc tat tga tga gga tga agt tgg cac ctt tgt gtg tgg tac
cac ctt tgg cgc acc aat tgc agc tac cgc cgg tgg aaa tct ttt cga cat gta cgt gca cgt
cac cta ctc tgg cac tg - 604 nt.**

vp24: Tamaño esperado del producto de PCR en 585 pb.

**49478 nt - gcc agg aga aaa tcg cat aca cag ata atg cct att tgt atc atc gat gtc ttc
gtc aaa cgt tgc tcc aaa cac aag tgt gtt gat cct att ttt ctt caa aac tgt tgg ttt gaa ata
taa tac aaa ttt gtt agc tga aaa ttc cct tcc tgt agc att tag acc tgg aga cag tga aac
aga gtc cac tgt tat atc cct ctt tgt att att gta tac tct tgc ata caa ttc taa ttc ttt aga ttc
ggc ttt gtt tac att tag tgt gtg gtc tcc gtc tcc aag taa aga tgt gag gat tat gtc tcc ttt ctt
ttt tac cag ttc aga atc gga cgt tcc ttg gcc agc tac ata tac ctt tcc ata gtt cct ggt ttg
taa tgt gcc gtt tac aaa gtt aaa gtg gtt tcc tct agc aac acc gtt aat gg t caa gtt tat tat
ttc aga ttc aac agg gta ggc gtc ttt atc ctt ctt gtc caa ttt ct t gtt aag ttc tat gtt ggt tac
aac tat aga tat aac cac gag tat caa tgt caa acc cgc cag tat agc ggc gta aac ccc -
50062 nt**

vp15: Tamaño esperado del producto de PCR en 311 pb

**163936 nt- gca ctc acc cgg gta caa taa gac aaa aat tat aaa ttg gga aga ccg ata
cag tct ttc atg aca aaa tac ccc gag aac aaa aga ttg ttg tct agg aac aaa gaa aca tta
aaa atg gtt gcc cga agc tcc aag acc aaa tcc cgc cgt gga agc aag aag agg tcc acc
act gct gga cgc atc tcc aag cgg agg agc cca tca atg aag aag cgt gca gga aag aag
agc tcc act gtc cgt cgc cgt tcc tca aag agc gga aag aag tct gga gcc
cgc aag tca agg cgt taa ttc ttc cct -164246nt**

vp26: Tamaño del producto esperado es de 569 pb.

**228258 nt- ttc ttg gag gtg aat cca atg ttc att gta gct tcg aag gct gcg ccg tct tca
aat ttg ctg cac acg tca atg agg gta att ttt gaa gat gaa gat tta atg tcc ttg ctc gag aag
taa gtg ttc gac ata gta ttt ccc tta atg ttt cct gca ata aca gtt ggc cga aca gta atg tcg
ttg atc aag aga tcg acg cca gtg ttg ttg agg atc ttc aaa gtc atg tta gag ttc tcg gcc
cca gtg cca gcg gga tca gtc ctt ggg gct gtg acg gta gag atg aca aga tca gca gaa
aca tcc ttc atg tcc tta tcg gag aga cca ttc ttc atg gcc acc ttt cca aga gga gta ttg tag
gac ctc tct cca cga att gac att acc ttt gcc ctt ctt tga att ggg act cgc atc atc tga tca
taa tta gcg acg acg ctt ctt cca aca cgt gtg ttg aat aca atc att ata acc atg ata acg att
aga gca atg att gca atg gaca aga ttg caa taa ttg caa cg t cca ggt ttg tta ggt tgc c
228826 nt**

vp19: Tamaño del producto esperado es de 363 pb.

290003 gcc tcc tct tgg ggt aag aca taa aaa cgg tgg cgg cgg aaa cga gga aca
gaa gag cgg acc cag cca gaa gca tca tat ccc tgg tcc tgt tct tat att tgt cct cat cat cgt
tat cgt tgg cag tgt cgt cat cat caa cgg tgt cct tat cag tgt cag aat cgc tgt cct tct ttg
gtc cca tcc ata cat tca tga cgg cca gga cga gga tac caa ttg aga tag caa cga tca
aaa aga gac cca tgc gag cca tag aca tgg agc ctt caa gat ctt cca tgg tgt aag aag
ggc cag cgg cct ggg ctc cgg tcc tgc cga aag gaaga gtg tta gtc gtg gtg gcc att t -
290365 nt

10. Clonación de los marcos de lectura abierta con el vector p MOS-Blue.

A partir de la amplificación de los marcos de lectura abierta obtenidos por PCR, que expresan las proteínas en cuestión, después de purificarlos se clonaron en el vector pMOS-Blue obteniéndose los plásmidos pMOS-VP28, pMOS-VP26, pMOS-VP19 y pMOS-VP15 que se describen a continuación.

11. Análisis del gene vp15

11a. Secuenciación del gene vp 15

Para el PCR se usó como templado DNA genómico del purificado viral de WSSV, utilizando los oligonucleótidos Fvp15: 5'- ggaagaattaacgccttgac-3' y Rvp15: 5'- gcactcaccgggtacaata-3'. El producto obtenido fue de 311 pb y después purificado en un gel de agarosa al 1%, clonado en pMOS-BLUE y secuenciado.

La secuencia obtenida se muestra en la Fig. 13.

```
GGGAAGAATTAACGCCTTGACTTGC GGGCTCCAGACTTCTTTCCGCTCTTTGAGGAACGG  
CGACGGACAGTGGAGCTCTTCTTTCCTGCACGCTTCTTCATTGATGGGCTCCTCCGCTTG  
GAGATGCGTCCAGCAGTGGTGGACCTCTTCTTGCTTCCACGGCGGGATTTGGTCTTGGAG  
CTTCGGGCAACCATTTTTAATGTTTCTTTGTTCTTAGACAACAATCTTTTGTCTCGGGG  
TATTTTGTTCATGAAAGACTGTATCGGTCTTCCCAATTTATAATTTTGTCTTATTGTACC  
CGGGTGAGTGC
```

Fig. 13. Secuencia nucleotídica del fragmento de 311 pb correspondiente al gene vp15 de WSSV. Se señalan los oligonucleótidos utilizados para amplificar el producto por PCR.

El fragmento codifica para una proteína de 71 aminoácidos en el marco de lectura +2, su peso teórico molecular es de 7983 kDa, con un pI de 9.01, como se muestra en la Fig. 14.

```

gggaagaattaacgccttgacttgccgggctccagacttctttccgctctttgaggaacgg
c
G R I N A L T C G L Q T S F R S L R N G
gacggacagtggagctcttctttcctgcacgcttcttcattgatgggctcctccgcttgg
D G Q W S S S F L H A S S L M G S S A W
agatgctccagcagtggtggacctcttcttgcctccacggcgggatttggctcttggagc
R C V Q Q W W T S S C F H G G I W S W S
ttcgggcaaccatttttaatgtttctttgttcttagacaacaatcttttgttctcgggggt
F G Q P F L M F L C S -
atthtgcattgaaagactgtatcggctcttcccaatttataatthtgcatttattgtacc
gggtgagtg

```

Fig. 14. Marco de lectura +2 del fragmento de 311 pb correspondiente al gene vp15.

11b. Análisis de hidrofobicidad de VP15.

El análisis de hidropatía de la proteína codificada por el fragmento de 311 bp no revela regiones hidrofóbicas transmembranales o regiones polares, presenta una hidrofobicidad de -0.01408 (Fig. 15)

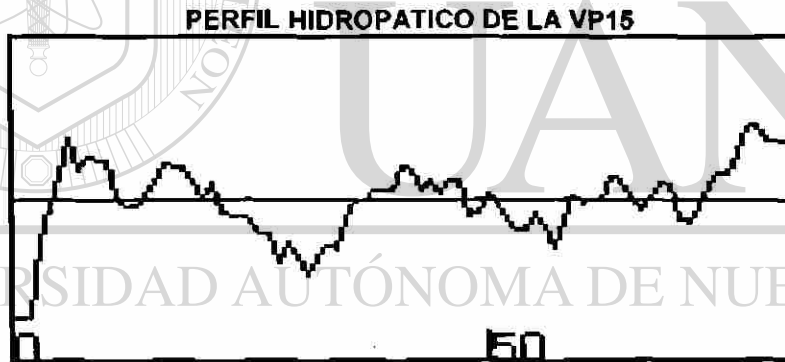


Fig. 15. El índice de hidrofobicidad de la proteína codificada por el fragmento de 311 pb del gene vp15.

11c. Análisis de homología y alineación múltiple de secuencias de vp 15.

La búsqueda en bancos de datos reveló la presencia de varias secuencias similares a la del fragmento de 311 bp (VP15), todas ellas perteneciente al virus WSSV de diferentes regiones geográficas. Estas secuencias se alinearon y se compraron utilizando el programa ClustaW (Fig. 16).

El análisis de esta comparación mostró que existen diferencias en donde se substituyen 2 nucleótidos en las secuencias reportadas, además de observar que en China1 no están los primeros 8 nucleótidos, China95 reporta un fragmento

menor que los demás y es de 197 nucleótidos. Con dos sustituciones se presenta el aislado China1: El nucleótido 20 es A (Adenina) para la secuencia China1 que viene a ser substituido por el nucleótido 28 G(Guanina, A →G) en las otras secuencias de los aislados geográficos, en el nucleótido 132 la A(Adenina) corresponde a la posición 124 de China1 substituida por T (Timina A→ T).

Taiwán	GGGAAGAATTAACGCCTTGACTTGCGGGCTCCAGACTTCTTTCCGCTCTTTGAGGAACGG	60
China95	GGGAAGAATTAACGCCTTGACTTGCGGGCTCCAGACTTCTTTCCGCTCTTTGAGGAACGG	60
México	GGGAAGAATTAACGCCTTGACTTGCGGGCTCCAGACTTCTTTCCGCTCTTTGAGGAACGG	60
Indonesia	GGGAAGAATTAACGCCTTGACTTGCGGGCTCCAGACTTCTTTCCGCTCTTTGAGGAACGG	60
China1	-----TTAACGCCTTGACTTGCGGGCTCCAGACTTCTTTCCGCTCTTTGAGGAACGG	52

Taiwán	CGACGGACAGTGGAGCTCTTCTTTCTGCACGCTTCTTCATTGATGGGCTCCTCCGCTTG	120
China95	CGACGGACAGTGGAGCTCTTCTTTCTGCACGCTTCTTCATTGATGGGCTCCTCCGCTTG	120
México	CGACGGACAGTGGAGCTCTTCTTTCTGCACGCTTCTTCATTGATGGGCTCCTCCGCTTG	120
Indonesia	CGACGGACAGTGGAGCTCTTCTTTCTGCACGCTTCTTCATTGATGGGCTCCTCCGCTTG	120
China1	CGACGGACAGTGGAGCTCTTCTTTCTGCACGCTTCTTCATTGATGGGCTCCTCCGCTTG	112

Taiwán	GAGATGCGTCCAGCAGTGGTGGACCTCTTCTTGCTTCCACGGCGGGATTGGTCTTGGAG	180
China95	GAGATGCGTCCAGCAGTGGTGGACCTCTTCTTGCTTCCACGGCGGGATTGGTCTTGGAG	180
México	GAGATGCGTCCAGCAGTGGTGGACCTCTTCTTGCTTCCACGGCGGGATTGGTCTTGGAG	180
Indonesia	GAGATGCGTCCAGCAGTGGTGGACCTCTTCTTGCTTCCACGGCGGGATTGGTCTTGGAG	180
China1	GAGATGCGTCCAGCAGTGGTGGACCTCTTCTTGCTTCCACGGCGGGATTGGTCTTGGAG	172

Taiwán	CTTCGGGCAACCATTTTAAATGTTTCTTTGTTCTAGACAACAATCTTTTGTTCTCGGG	240
China95	CTTCGGGCAACCATTTT-----	197
México	CTTCGGGCAACCATTTTAAATGTTTCTTTGTTCTAGACAACAATCTTTTGTTCTCGGG	240
Indonesia	CTTCGGGCAACCATTTTAAATGTTTCTTTGTTCTAGACAACAATCTTTTGTTCTCGGG	240
China1	CTTCGGGCAACCATTTTAAATGTTTCTTTGTTCTAGACAACAATCTTTTGATCTCGGG	232

Taiwan	TATTTTGTGCATGAAAGACTGTATCGGTCTTCCCAATTTATAATTTTGTCTTATTGTACC	300
China95	-----	---
México	TATTTTGTGCATGAAAGACTGTATCGGTCTTCCCAATTTATAATTTTGTCTTATTGTACC	300
Indonesia	GGTATTTTGTGCATGAAAGACTGTATCGGTCTTCCCAATTTATAATTTTGTCTTAT----	296
China1	TATTTTGTGCAT-----	243

Taiwan	CGGGTGAGTGC	311
China95	-----	---
México	CGGGTGAGTGC	311
Indonesia	-----	---
China1	-----	---
México:-0.00396; Indonesia:-0.00415, China1:0.01650 0.00734:0.00396, Taiwán:-0.00396, China95:0.01411)		

Fig. 16. Comparación de las secuencias reportadas para el gene vp15 de diferentes regiones geográficas: México (este trabajo). El título original de las secuencias en el GenBank, se substituye por el origen geográfico. Taiwán (148888 a 148578; AF440570), China95 (China 95/Dalian, AY245784) Indonesia (Indonesia 97, AY249453) y China1 (AY220743). Se indica el número de acceso en el GenBank/EMBL .

Con dos sustituciones tenemos también a la secuencia de China95, donde se sustituye a T (Timina) → C (Citosina) en el nucleótido 155 y C (Citosina) → T (Timina) en el nucleótido 157. Indonesia C (Citosina) → T (Timina) en el nucleótido 213, C(Citosina) → T(Timina) en el nucleótido 235. El aislado de Taiwán presentó 100% de homología con el de México (aquí descrito).

Por otro lado, se encontró que la secuencia del aislado de Taiwán (AF440570) es 100% similar a la del aislado Tailandia (AF369029); la del aislado Indonesia (Indonesia 97, AY249453) a la de los aislados Japón 98 (AY249452), US 98/South Carolina (AY249451), China 99/Qindao (AY249450) y China 95/Dalian (AY249449).

11d. Análisis filogenético del gene vp15.

El análisis filogenético de los resultados obtenidos por ClustalW 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 quienes 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 (Fig. 17).

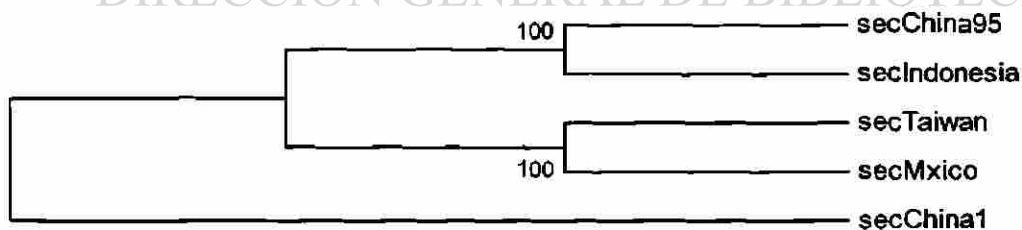


Fig. 17. Árbol filogenético generado con los datos obtenidos de la comparación ClustalW, para el gene de la VP15 de WSSV, México: 0.00396, (Indonesia: 0.00415, China1:0.01650:0.00734): 0.00396, Taiwán:-0.00396, China95:0.01411. Los números sobre la rama indican el valor del "bootstrap" después de las 1000 replicas/1000 remuestrados).

11e. Análisis de alineación múltiple de secuencias de proteínas homólogas a VP15.

El análisis de alineación múltiple de secuencias (CLUSTALW) de las proteínas codificadas, se describe en la Fig. 18 con detalle, donde se muestran las sustituciones de los aminoácidos Q → L en China1 y F→L China 95 en las posiciones 43 de Taiwán (40 de China1) y 52 de China95. En el aislado de Indonesia se muestra un fragmento de 27 aminoácidos mayor al resto de las secuencias analizadas, con una sustitución de S→ F en la posición 71.

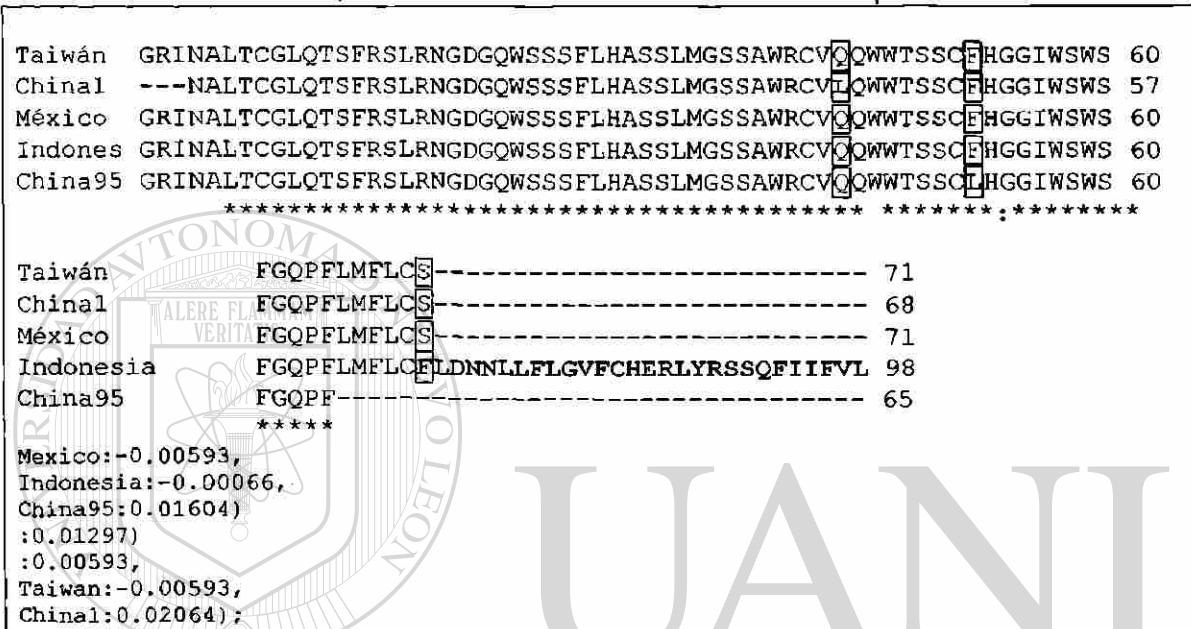


Fig. 18. Alineación múltiple de las proteínas VP15 con mayor homología al aislado mexicano con el programa Clustal W.

El análisis filogenético con el programa MEGA, agrupa dos cluster principales, uno de ellos agrupando las secuencias de aminoácidos de VP15 de México y Taiwán, presumiblemente con el mismo origen o ancestro evolutivo del cual se separa la variante China 1 y un segundo grupo con China 95 e Indonesia (Fig. 19).

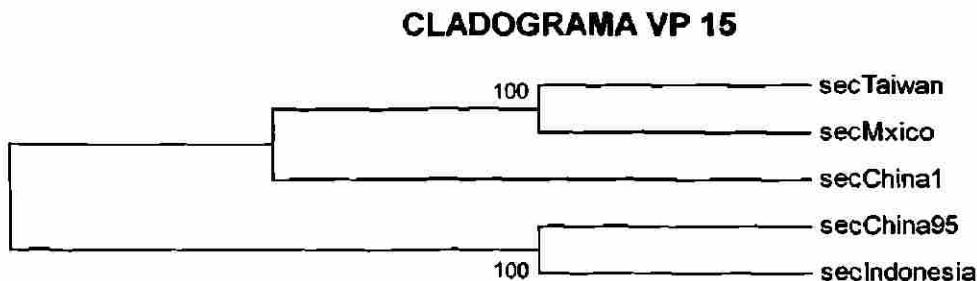


Fig. 19. Árbol filogenético para la proteína VP15, con el programa MEGA (500 y 1000 repeticiones) con las secuencias de referencia de la Fig. 18. El número sobre la rama indica el valor del "bootstrap"

12. Análisis del gene vp28

12a. Secuenciación del gene vp 28:

Para la obtención y secuenciación nucleotídica para el gene vp28 se utilizaron los primers: F: 5' TGT, GAC, CAA, GAC, CAT CGA,AA 3', y R: 5' CAG TGC CAG AGT AGG,TGA CG 3', amplificando un producto de 508 pb. La secuencia se describe con detalle en la Fig. 20.

```
GTGACCAAGACCATCGAAACCCACACAGACAATATCGAGACAAACATGGATGAAAACCTCC
GCATTCTGTGACTGCTGAGGTTGGATCAGGCTACTTCAAGATGACTGATGTGTCTTTGA
CAGCGACACCTTGGGCAAATCAAGATCCGCAATGGAAAGTCTGATGCACAGATGAAGGAA
GAAGATGCGGATCTTGTTCATCACTCCCGTGGAGGGCCGAGCACTCGAAGTGACTGTGGGGC
AGAATCTCACCTTTGAGGGAACATTCAAGGTGTGGAACAACACATCAAGAAAGATCAACAT
CACTGGTATGCAGATGGTGCCAAAGATTAACCCATCAAAGGCCTTTGTCCGTAGCTCCAAC
ACCTCCTCCTTACCCCCGTCTCTATTGATGAGGATGAAGTTGGCACCTTTGTGTGTGGTA
CCACCTTTGGCGCACCAATTGCAGCTACCGCCGGTGGAAATCTTTTCGACATGTACGTGCA
CGTCACCTACTCTGGCACTG
```

Fig.20. Secuencia nucleotídica del fragmento de 508pb correspondientes al gene vp28 de WSSV.

La traducción correspondiente a proteína indica que está constituido por 172 aminoácidos con el marco de lectura +1. La traducción completa se cita a continuación (Fig. 21).

```
gtgaccaagaccatcgaaacccacacagacaatatcgagacaaacatggatgaaaacctc
V T K T I E T H T D N I E T N M D E N L
cgcattcctgtgactgctgaggttggatcaggctacttcaagatgactgatgtgtccttt
R I P V T A E V G S G Y F K M T D V S F
gacagcgacaccttgggcaaaatcaagatccgcaatggaaagtctgatgcacagatgaag
D S D T L G K I K I R N G K S D A Q M K
gaagaagatgCGGatccttgtcatcactcccgtggagggccgagcactcgaagtgactgtg
E E D A D L V I T P V E G R A L E V T V
gggcagaatctcacctttgagggAACattcaaggtgtggaacaacacatcaagaaagatc
G Q N L T F E G T F K V W N N T S R K I
aacatcactggtatgcagatggtgccaaagattaacccatcaaaggcctttgtcggtagc
N I T G M Q M V P K I N P S K A F V G S
tccaacacctcctccttCACCCCCGTCTCTATTGATGAGGATGAAGTTGGCACCTTTGTG
S N T S S F T P V S I D E D E V G T F V
tgtggtaccacctttggcgcaccaattgcagctacCGCCGGTGGAAATCTTTTCGACATG
C G T T F G A P I A A T A G G N L F D M
tacgtgcacgtcacctactctggcactgagaccgag
Y V H V T Y S G T E T E
```

Fig. 21. Marco de Lectura +1 del fragmento de 508 pb correspondientes al gene VP28, constituido por 172 AA; con un peso molecular de 18632.

12b. Análisis de hidrofobicidad

El programa SOSUI, para la clasificación y predicción de estructuras secundarias de proteínas transmembranales, indica que el fragmento VP 28 analizado es de una proteína soluble, cuya secuencia de aminoácidos no tiene péptido señal. El promedio de hidrofobicidad es de -0.277326.

El peso molecular estimado es de 18, 632 kD con un pI de 4.63. Se encontró que el número total de residuos cargados negativamente (Asp+Glu) es de 24 y de residuos cargados positivamente (Arg+Lys) es de 14. El N-terminal de la secuencia es considerado V (Val).

La composición de aminoácidos de la proteína fue determinada con base en el análisis de secuencias de un fragmento de DNA WSSV, iniciada en el extremo amino terminal del producto de PCR de vp28, generado por los primers F: 5' TGT, GAC, CAA, GAC, CAT CGA,AA 3', y R: 5' CAG TGC CAG AGT AGG,TGA CG 3', amplificado del purificado viral de WSSV y después purificado en un gel de agarosa al 1%, clonado en p MOSBLUE y secuenciado.

12c. Análisis de homología y de alineación múltiple de secuencias de vp28

La búsqueda en bancos de datos reveló la presencia de varias secuencias similares a la del fragmento de 508 bp (VP28), todas ellas perteneciente al virus WSSV de diferentes regiones geográficas. Estas secuencias se compraron utilizando el programa Blast (EMBL), observándose que el aislado mexicano presenta una homología del 100 % (508/508) con los aislados de Vietnam (EMBL No. AJ 551447), Korea 01 (AY324881), Japón 98 (AY249443), EUA 98/Sur Carolina (AY249442), Indonesia 97 (AY249441), China 99/Qindao (AY249440), Taiwán (AF440570) y AF 272979; Tailandia (AF369029, AF173993) y China (AF332093, AF227911), así como con otras de origen no reportado, con el acceso No AJ551447, AY168644; AX081309, AY008843.

La secuencia de VP28 analizada, tiene una homología del 99 % con los aislados de China (No. acceso AF502435), China 95/Dalian (AY249434), Korea (AF380842) y una de la India, con el No de acceso AY422228.

En el siguiente Clustal W (1.82) de alineación múltiple, se comparan las secuencias nucleótidos para el gene vp28 de varias regiones geográficas (Se cita la secuencia y la clave de acceso en el GenBank/EMBL en la Fig. 22).

Clustal W (1.82) de alineación múltiple para el gene VP28:

Méxic	GTGACCAAGACCATCGAAACCC	A	CACAGACAATATCGAGACAAACATGGATGAAAACCTC	60
Taiwa	GTGACCAAGACCATCGAAACCC	A	CACAGACAATATCGAGACAAACATGGATGAAAACCTC	60
China	GTGACCAAGACCATCGAAACCC	G	CACAGACAATATCGAGACAAACATGGATGAAAACCTC	60
Korea	GTGACCAAGACCATCGAAACCC	A	CACAGACAATATCGAGACAAACATGGATGAAAACCTC	60
India	GTGACCAAGACCATCGAAACCC	A	CACAGACAATATCGAGACAAACATGGATGAAAACCTC	60

Méxic	CGCATTCCCTGTGACTGCTGAGGTTGGATCAGGCTACTTCAAGATGACTGATGTGTCCCTT			120
Taiwa	CGCATTCCCTGTGACTGCTGAGGTTGGATCAGGCTACTTCAAGATGACTGATGTGTCCCTT			120
China	CGCATTCCCTGTGACTGCTGAGGTTGGATCAGGCTACTTCAAGATGACTGATGTGTCCCTT			120
Korea	CGCATTCCCTGTGACTGCTGAGGTTGGATCAGGCTACTTCAAGATGACTGATGTGTCCCTT			120
India	CGCATTCCCTGTGACTGCTGAGGTTGGATCAGGCTACTTCAAGATGACTGATGTGTCCCTT			120

Méxic	GACAGCGACACCTTGGGCAAATCAAGATCCGCAATGGAAAGTCTGATGCACAGATGAAG			180
Taiwa	GACAGCGACACCTTGGGCAAATCAAGATCCGCAATGGAAAGTCTGATGCACAGATGAAG			180
China	GACAGCGACACCTTGGGCAAATCAAGATCCGCAATGGAAAGTCTGATGCACAGATGAAG			180
Korea	GACAGCGACACCTTGGGCAAATCAAGATCCGCAATGGAAAGTCTGATGCACAGATGAAG			180
India	GACAGCGACACCTTGGGCAAATCAAGATCCGCAATGGAAAGTCTGATGCACAGATGAAG			180

Méxic	GAAGAAGATGCGGATCTTGTTCATCACTCCCGTGGAGGGCCGAGCACTCGAAGTGACTGTG			240
Taiwa	GAAGAAGATGCGGATCTTGTTCATCACTCCCGTGGAGGGCCGAGCACTCGAAGTGACTGTG			240
China	GAAGAAGATGCGGATCTTGTTCATCACTCCCGTGGAGGGCCGAGCACTCGAAGTGACTGTG			240
Korea	GAAGAAGATGCGGATCTTGTTCATCACTCCCGTGGAGGGCCGAGCACTCGAAGTGACTGTG			240
India	GAAGAAGATGCGGATCTTGTTCATCACTCCCGTGGAGGGCCGAGCACTCGAAGTGACTGTG			240

Méxic	GGGCAGAATCTCACCTTTGAGGGAACATTCAAGGTGTGGAACAACACATCAAGAAAGATC			300
Taiwa	GGGCAGAATCTCACCTTTGAGGGAACATTCAAGGTGTGGAACAACACATCAAGAAAGATC			300
China	GGGCAGAATCTCACCTTTGAGGGAACATTCAAGGTGTGGAACAACACATCAAGAAAGATC			300
Korea	GGGCAGAATCTCACCTTTGAGGGAACATTCAAGGTGTGGAACAACACATCAAGAAAGATC			300
India	GGGCAGAATCTCACCTTTGAGGGAACATTCAAGGTGTGGAACAACACATCAAGAAAGATC			300

Méxic	AACATCACTGGTATGCAGATGGTGCCAAAGATTAACCCATCAAAGGCC			360
Taiwa	AACATCACTGGTATGCAGATGGTGCCAAAGATTAACCCATCAAAGGCC			360
Chi95	AACATCACTGGTATGCAGATGGTGCCAAAGATTAACCCATCAAAGGCC			360
Korea	AACATCACTGGTATGCAGATGGTGCCAAAGATTAACCCATCAAAGGCC			360
India	AACATCACTGGTATGCAGATGGTGCCAAAGATTAACCCATCAAAGGCC			360

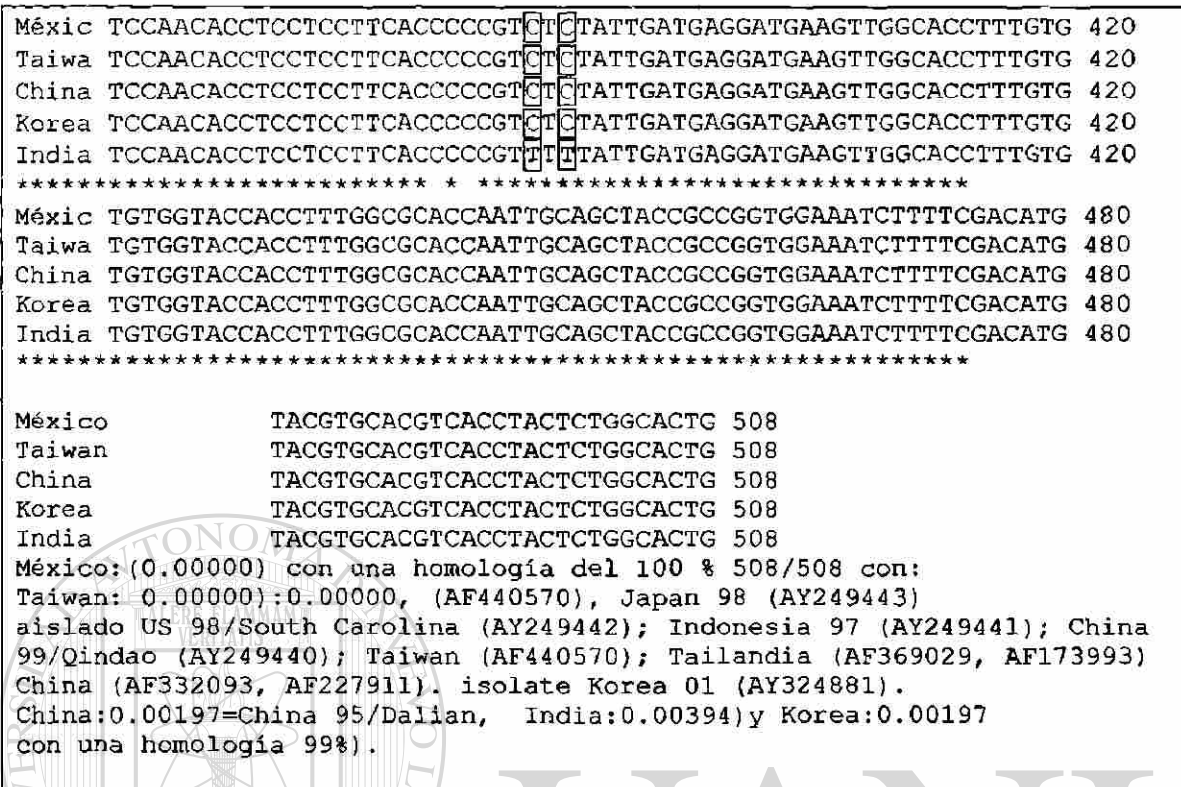


Fig. 22. Alineación múltiple de secuencias de la región estudiada de vp28 y secuencias homólogas obtenidas de la comparación Blast (EMBL). Se enmarcan las sustituciones de nucleótidos

El análisis mostró que existen diferencias en donde se substituyen 1 o 2 nucleótidos en las secuencias reportadas. Con una sustitución de A (adenina)

→G (Guanina) en el nucleótido 23; se presenta el aislado China, C (Citosina) →T (Timina) en el nucleótido 348 de Korea. En la secuencia de la India se observan dos sustituciones C (Citosina) →T(Timina) en el nucleótido 387 y C(Citosina) →T(Timina) en el nucleótido 389.

12d. Análisis filogenético del gene vp28:

El análisis filogenético N-J, Kimura-2, con 1000 reposiciones 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 Fig. 23 con la misma rama evolutiva y niveles de bootstrap del 71-99 % que consideramos confiable. Las secuencias con el 99 % de homología (China95/Dalian; KoreaAF380842 y ChinaAF502435) se ubican

en el mismo cluster donde se encuentra México, más en cambio, para la secuencia de India, con el 99% de homología, se obtuvieron resultados de un ancestro evolutivo diferente.

CLADOGRAMA DEL FRAGMENTO DEL GENE vp28

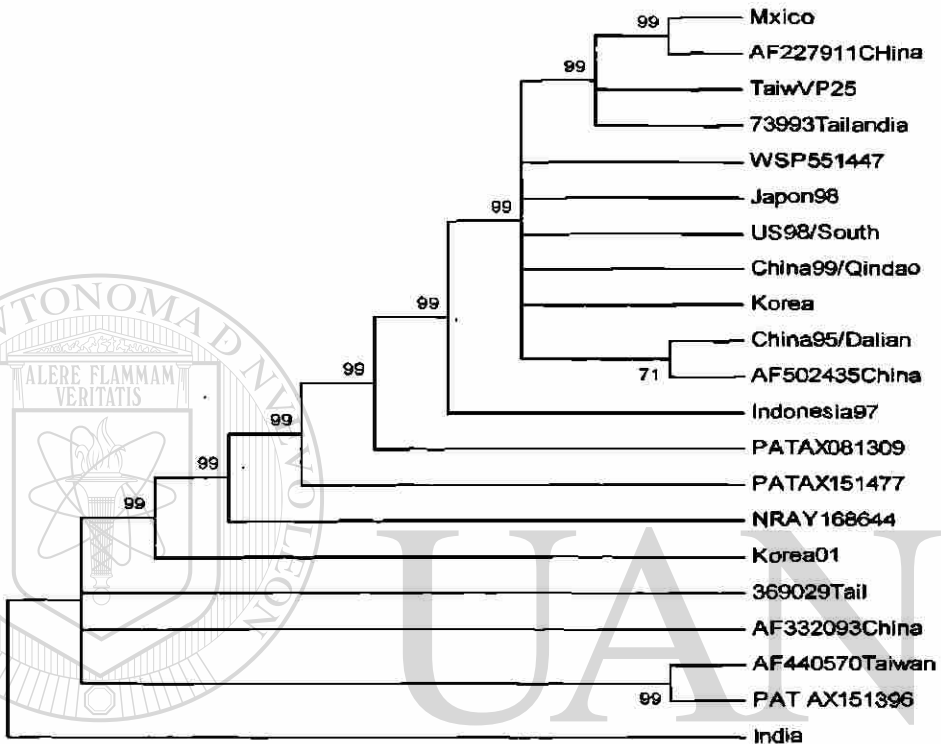


Fig. 23a. Árbol filogenético de las secuencias homólogas a VP28 del aislado mexicano. Análisis con el modelo N-J, Kimura-2 (1000 reposiciones y 500 remuestreos, transiciones+transversiones) con el programa MEGA.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En cambio, con el mismo modelo (N-J, Kimura-2) pero con 1000 reposiciones y 50258 remuestreos, la predicción evolutiva marcó tres grandes grupos, uno de ellos con ramas evolutivas cercanas o relacionadas, donde se ubica el aislado de México, US98/South Carolina y otras con el 100 % de homología, y únicamente India de las secuencias con el 99 % de similitud. Los niveles de "bootstrap" alcanzan el 63 %, considerándolo menos informativo que el análisis anterior.

CLADOGRAMA DEL FRAGMENTO DEL GENE vp28 (Continuación)

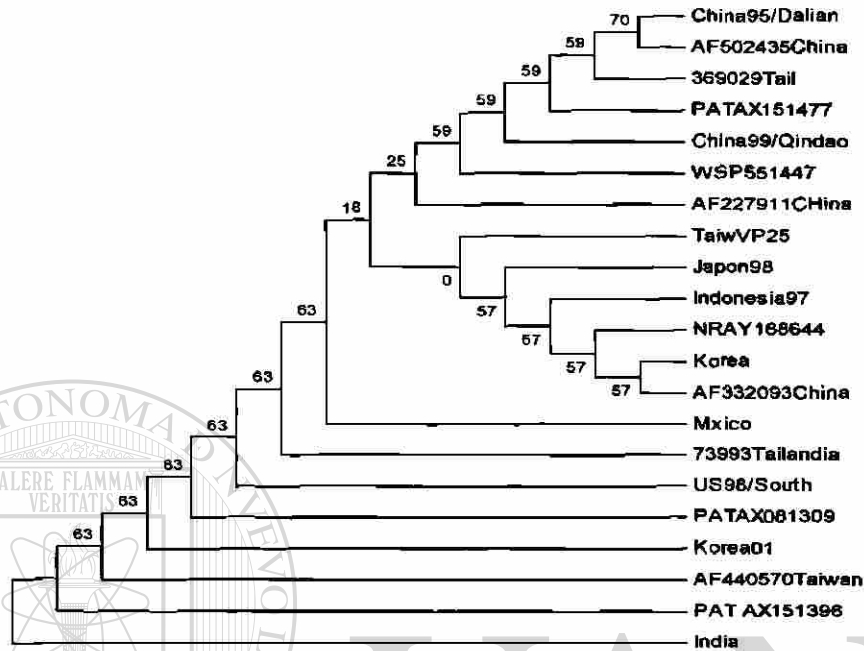


Fig. 23 b. Árbol filogenético de la secuencia analizada del gene VP28 de diferentes aislados del virus WSSV. De acuerdo a esta predicción, el aislado mexicano evolucionó de ancestros filogenéticamente cercanos, a los de Tailandia, US98/South Carolina, Korea, Taiwán e India, relacionados entre sí.

12e. Análisis de homología y alineación múltiple de secuencias de la proteína VP28.

La alineación Clustal W de las secuencias de aminoácidos similares u homólogas de VP28, mostró que existen diferencias en donde se substituyen un aminoácido en las secuencias reportadas. Con una substitución se presenta el aislado China de H (Histidina) → R (Arginina) en el aminoácido 8, y otra substitución en el aislado de la India S (Serina) → F (Fenilalanina) en el aminoácido 130. El aislado de Taiwán presentó 100% de homología con el de México, tal como se presentó en la Fig. 24a.

Los aislados de México y China forman un grupo con la misma rama evolutiva; Korea e India forman un segundo grupo relacionado filogenéticamente, mientras que Taiwán se presenta como un aislado con una rama evolutiva separada (Fig.

24b). El análisis filogenético se realizó con 1000 reposiciones y 20540 remuestreos en el programa MEGA.

Korea	VTKTIETHITDNIETNMDENLRIPVTAEVGSGYFKMTDVSFSDTLGKIKIRNGKSDAQMK	60
India	VTKTIETHITDNIETNMDENLRIPVTAEVGSGYFKMTDVSFSDTLGKIKIRNGKSDAQMK	60
Taiwa	VTKTIETHITDNIETNMDENLRIPVTAEVGSGYFKMTDVSFSDTLGKIKIRNGKSDAQMK	60
Méxic	VTKTIETHITDNIETNMDENLRIPVTAEVGSGYFKMTDVSFSDTLGKIKIRNGKSDAQMK	60
China	VTKTIETHITDNIETNMDENLRIPVTAEVGSGYFKMTDVSFSDTLGKIKIRNGKSDAQMK	60

Korea	EEDADLVITPVEGRALEVTVGQNLTFEGTFKVVNNTSRKINITGMQMPKINPSKAFVGS	120
India	EEDADLVITPVEGRALEVTVGQNLTFEGTFKVVNNTSRKINITGMQMPKINPSKAFVGS	120
Taiwa	EEDADLVITPVEGRALEVTVGQNLTFEGTFKVVNNTSRKINITGMQMPKINPSKAFVGS	120
Méxic	EEDADLVITPVEGRALEVTVGQNLTFEGTFKVVNNTSRKINITGMQMPKINPSKAFVGS	120
China	EEDADLVITPVEGRALEVTVGQNLTFEGTFKVVNNTSRKINITGMQMPKINPSKAFVGS	120

Korea	SNTSSFTPVSIDEDEVGTFVCGTTFGAPIAATAGGNLFDMYVHVHTYSGT	169
India	SNTSSFTPVSIDEDEVGTFVCGTTFGAPIAATAGGNLFDMYVHVHTYSGT	169
Taiwan	SNTSSFTPVSIDEDEVGTFVCGTTFGAPIAATAGGNLFDMYVHVHTYSGT	169
México	SNTSSFTPVSIDEDEVGTFVCGTTFGAPIAATAGGNLFDMYVHVHTYSGT	169
China	SNTSSFTPVSIDEDEVGTFVCGTTFGAPIAATAGGNLFDMYVHVHTYSGT	169

México: 0.00000, China: 0.00592):0.00000, Taiwán: 0.00000):0.00000, Korea:0.00000, India:0.00592).		

Fig. 24a. Comparación de las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos reportadas para el gene VP28 de diferentes regiones geográficas para México (este trabajo), China (AF502435), Korea (AF380842), India (AY422228), Taiwán (AF440570). Las sustituciones de H → R en el aislado de China y S → F en el de la India se enmarcan en las secuencias.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

CLADOGRAMA DEL FRAGMENTO ANALIZADO DE VP28
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

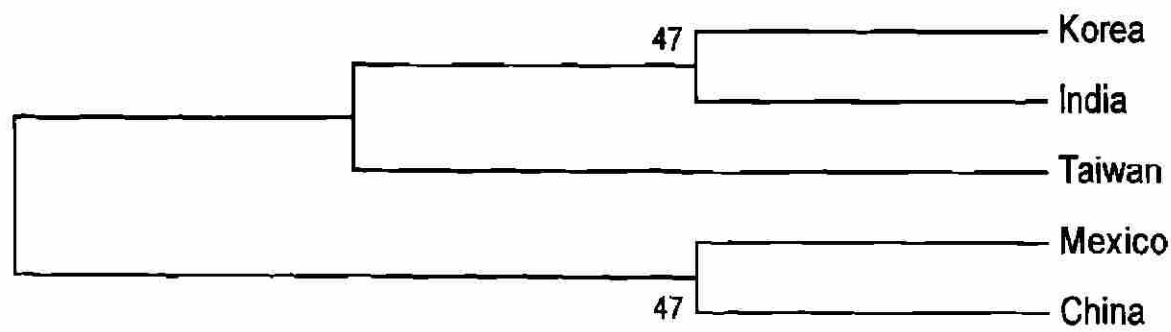


Fig. 24 b. Árbol filogenético de un segmento de la proteína VP28 estudiada en el aislado mexicano de WSSV. El aislado mexicano se relaciona evolutivamente con el de China. Análisis "bootstrap" con el modelo Kimura-2. En las ramas se indica el valor de "bootstrap".

13 Análisis del gene VP26

13a. Secuenciación del gene vp 26:

El segmento analizado del gene vp 26, está constituido por 569 nucleótidos, amplificado por los primers vp26F 5'-ttc ttg gag gtg aat cca atg-3' y vp26R 5'-ggc aac cta aca aac ctg ga-3', tal como se indica en la Fig. 25.

```
1- TTC TTG GAG GTG AAT CCA ATG TTC ATT GTA GCT TCG AAG GCT GCG CCG TCT TCA
AAT TTG CTG CAC ACG TCA ATG AGG GTA ATT TTT GAA GAT GAA GAT TTA ATG TCC
TTG CTC GAG AAG TAA GTG TTC GAC ATA GTA TTT CCC TTA ATG TTT CCT GCA ATA ACA
GTT GGC CGA ACA GTA ATG TCG TTG ATC AAG AGA TCG ACG CCA GTG TTG TTG AGG
ATC TTC AAA GTC ATG TTA GAG TTC TCG GCC CCA GTG CCA GCG GGA TCA GTC CTT
GGG GCT GTG ACG GTA GAG ATG ACA AGA TCA GCA GAA ACA TCC TTC ATG TCC TTA
TCG GAG AGA CCA TTC TTC ATG GCC ACC TTT CCA AGA GGA GTA TTG TAG GAC CTC
TCT CCA CGA ATT GAC ATT ACC TTT GCC CTT CTT TGA ATT GGG ACT CGC ATC ATC
TGA TCA TAA TTA GCG ACG ACG CTT CTT CCA ACA CGT GTG TTG AAT ACA ATC ATT ATA
ACC ATG ATA ACG ATT AGA GCA ATG ATT GCA ATG GACA AGA TTG CAA TAA TTG CAA
CG T CCA GGT TTG TTA GGT TGC C- 569
```

REVERSO COMPLEMENTO

```
569-GGCAACCTAACAACCTGGACGTTGCAATTATTGCAATCTTGTCCATTGCAATCATTGCT
CTAATCGTTATCATGGTTATAATGATTGTATTCAACACACGTTGTTGGAAGAAGCGTCGTC
GCTAATTATGATCAGATGATGCGAGTCCCAATTCAAAGAAGGGCAAAGGTAATGTCAATT
CGTGGAGAGAGGTCTTACAATACTCCTCTTGGAAAGGTGGCCATGAAGAATGGTCTCTCC
GATAAGGACATGAAGGATGTTTCTGCTGATCTTGTGTCATCTCTACCGTCACAGCCCCAAGG
ACTGATCCCGCTGGCACTGGGGCCGAGAACTCTAACATGACTTTGAAGATCCTCAACAAC
ACTGGCGTGCATCTTGTGATCAACGACATTACTGTTGCGCCAAGTATTGTCAGGAAAC
ATTAAGGGAAATACTATGTGCAACACTTACTTCTCGAGCAAGGACATTAATCTTCATCT
TCAAAAATTACCCTCATTGACGTGTGACGAAATTTGAAGACGGCGCAGCCTTCGAAGCT
ACAATGAACATTGGATTCACCTCCAAGAA -1
```

Fig. 25. Secuencia nucleotídica de la región analizada de vp26, conteniendo 569 nucleótidos. La posición de los primers para PCR aparece en negritas.

La región génica vp 26 amplificada y clonada, codifica a una proteína de 189 aminoácidos en un marco de lectura +1, con una talla teórica de 20335 KDa, además de tener un pH básico con un punto isoeléctrico de 9.44 y una hidrofobicidad de 0.180952 (Fig. 26).

```

ggcaacctaacaacacctggacgttgcaattattgcaatcttgtccattgcaatcattgct
G N L T N L D V A I I A I L S I A I I A
ctaatcgttatcatgggtataatgattgtattcaacacacgtggtggaagaagcgtcgtc
L I V I M V I M I V F N T R V G R S V V
gctaattatgatcagatgatgacgagtcaccaattcaagaaggcgaaggtaatgtcaatt
A N Y D Q M M R V P I Q R R A K V M S I
cgtggagagaggtcctacaatactcctcttggaaaggtggccatgaagaatggtctctcc
R G E R S Y N T P L G K V A M K N G L S
gataaggacatgaaggatgtttctgctgatcttgtcatctctaccgtcacagccccaagg
D K D M K D V S A D L V I S T V T A P R
actgatcccgctggcactggggccgagaactctaacatgactttgaagatcctcaacaac
T D P A G T G A E N S N M T L K I L N N
actggcgtcgatctcttgatcaacgacattactgttcggccaactgttattgcaggaaac
T G V D L L I N D I T V R P T V I A G N
attaagggaaataactatgtcgaacacttacttctcgagcaaggacattaaatcttcatct
I K G N T M S N T Y F S S K D I K S S S
tcaaaaattaccctcattgacgtgtgcagcaaatgaagacggcgcagccttcgaagct
S K I T L I D V C S K F E D G A A F E A
acaatgaacattggattcacctccaagaa
T M N I G F T S K

```

Fig. 26. Marco de lectura +1 de VP26. Secuencia de aminoácidos de la proteína VP26, constituida por 189 aminoácidos.

13b. Análisis de hidrofobicidad.

El programa SOSUI, para la clasificación y predicción de estructuras secundarias de proteínas transmembranales, indica que el fragmento VP 26 analizado es de una proteína soluble, cuya secuencia de aminoácidos tiene una región que posee las propiedades adecuadas de una proteína membranal la cual tiene una conformación hélice β . La región transmembranal se localiza del aminoácido 9 al 31, con una longitud de 23 aminoácidos. La secuencia correspondiente es AIIAILSIIALIVIMVIMVF. El extremo N-terminal es la alanina (A) y el extremo C-terminal es fenilalanina (F).

No.	N terminal	Región transmembranal	C terminal	tipo	longitud
1	9	AIIAILSIIALIVIMVIMVF	31	Primaria	23

Fig. 27. Región transmembranal de VP26. La longitud que predice el programa SOSUI es de 23 aminoácidos (9-31)

La proteína VP26 presenta 16 residuos con carga negativa (Asp + Glu) y 21 cargados positivamente (Arg+Lys). El perfil de hidropatía predice la posición de la región transmembranal del aminoácido 9 al 31, representada en la Fig. 28.

PERFIL DE HIDROFOBICIDAD

28a

28b

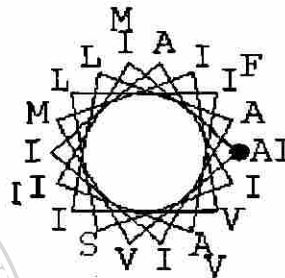
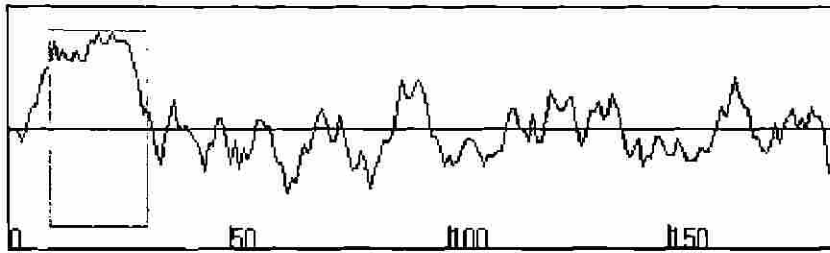


Fig. 28. Gráfica del perfil de hidrofobicidad de VP26. 28 a) La región transmembranal se sitúa en el marco verde, de acuerdo a los datos generados con el programa SOSUI. 28b) Se presenta la predicción de la hélice alfa en forma de rueda de carreta, y se muestra el orden de los aminoácidos de la región transmembranal (AIIAILSIAIILIVIMVIMIVF), donde S representa un residuo polar con carga positiva.

MODELO DE LA REGION TRANSMEMBRANAL



Fig. 29. Modelo de la región transmembranal de VP26, donde se muestra el orden de los aminoácidos (AIIAILSIAIILIVIMVIMIVF) a través de la membrana.

El modelo virtual para predecir la conformación de la hélice transmembranal se muestra en la Fig. 29.

La composición de aminoácidos de la proteína fue determinada con base en el análisis de secuencias de un fragmento de DNA WSSV, iniciada en el extremo amino terminal del producto de PCR de vp28, generado por los primers vp26F 5'- ttc ttg gag gtg aat cca atg-3' y vp26R 5'-ggc aac cta aca aac ctg ga-3', amplificado a partir del purificado viral de WSSV, purificado en un gel de agarosa al 1%, clonado en p MOSBLUE y secuenciado.

13c. Análisis de homología y alineación múltiple de secuencias del gene vp26

Con el programa Blast (Blosum 62, EMBI) se realizó la búsqueda de fragmentos similares al producto vp26 del aislado mexicano de WSSV, encontrándose en la mayoría una homología del 100% (569/569) en secuencias similares de VP 26 con orientación positiva y un fragmento en orientación negativa. Solo en dos casos se presentó homología del 99 % (Pat. DINH, WSP551446 y AY220746, llamada VP26), ambas sin referencia geográfica del aislado viral. Posteriormente se alinearon las secuencias con el programa Clustal W (1.82) de alineación múltiple, se compararon las secuencias de varias regiones geográficas (Se cita a continuación la secuencia y la clave de acceso en el GenBank/EMBL (Fig. 30).

CLUSTAL W (1.82)

```

VP26AY220746      GGCAACCTAACAAACCTGGACGTTGCAATTATTGCAATCTGTGCCATTGCAATCATTGCT 60
NOREFAX081308    GGCAACCTAACAAACCTGGACGTTGCAATTATTGCAATCTGTGCCATTGCAATCATTGCT 60
INDIAN AY422230   GGCAACCTAACAAACCTGGACGTTGCAATTATTGCAATCTGTGCCATTGCAATCATTGCT 60
VP26PATAF380841 GGCAACCTAACAAACCTGGACGTTGCAATTATTGCAATCTGTGCCATTGCAATCATTGCT 60
PAXU AX151533    GGCAACCTAACAAACCTGGACGTTGCAATTATTGCAATCTGTGCCATTGCAATCATTGCT 60
PW109340AX081316 GGCAACCTAACAAACCTGGACGTTGCAATTATTGCAATCTGTGCCATTGCAATCATTGCT 60
INDON97AY249439 GGCAACCTAACAAACCTGGACGTTGCAATTATTGCAATCTGTGCCATTGCAATCATTGCT 60
JAPON 98AY249438 GGCAACCTAACAAACCTGGACGTTGCAATTATTGCAATCTGTGCCATTGCAATCATTGCT 60
WSMEX            GGCAACCTAACAAACCTGGACGTTGCAATTATTGCAATCTGTGCCATTGCAATCATTGCT 60
DINH WSP551446   GGCAACCTAACAAACCTGGACGTTGCAATTATTGCAATCTGTGCCATTGCAATCATTGCT 60
VE22AF272980    GGCAACCTAACAAACCTGGACGTTGCAATTATTGCAATCTGTGCCATTGCAATCATTGCT 60
26KDAF173992    GGCAACCTAACAAACCTGGACGTTGCAATTATTGCAATCTGTGCCATTGCAATCATTGCT 60
P22MRAF308164   GGCAACCTAACAAACCTGGACGTTGCAATTATTGCAATCTGTGCCATTGCAATCATTGCT 60
CHI95/DALIAY249435 GGCAACCTAACAAACCTGGACGTTGCAATTATTGCAATCTGTGCCATTGCAATCATTGCT 60
CHIN99/QINDAO AY249436 GGCAACCTAACAAACCTGGACGTTGCAATTATTGCAATCTGTGCCATTGCAATCATTGCT 60
US98/SCAROL AY249437 GGCAACCTAACAAACCTGGACGTTGCAATTATTGCAATCTGTGCCATTGCAATCATTGCT 60
*****

```

```

AY220746      CTAATCGTTATCATGGTTATAATGATTGTATTCAACACACGTTGGAAGAAGCGTCGTC 120
AX081308     CTAATCGTTATCATGGTTATAATGATTGTATTCAACACACGTTGGAAGAAGCGTCGTC 120
AY422230     CTAATCGTTATCATGGTTATAATGATTGTATTCAACACACGTTGGAAGAAGCGTCGTC 120
AF380841     CTAATCGTTATCATGGTTATAATGATTGTATTCAACACACGTTGGAAGAAGCGTCGTC 120
AX151533     CTAATCGTTATCATGGTTATAATGATTGTATTCAACACACGTTGGAAGAAGCGTCGTC 120
AX081316     CTAATCGTTATCATGGTTATAATGATTGTATTCAACACACGTTGGAAGAAGCGTCGTC 120
AY249439     CTAATCGTTATCATGGTTATAATGATTGTATTCAACACACGTTGGAAGAAGCGTCGTC 120
AY249438     CTAATCGTTATCATGGTTATAATGATTGTATTCAACACACGTTGGAAGAAGCGTCGTC 120

```

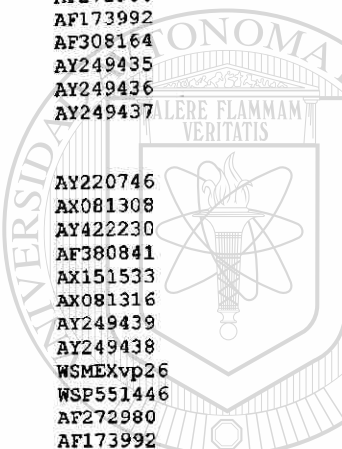
WSMEXIvp2 CTAATCGTTATCATGGTTATAATGATTGTATTCAACACACGTTGGGAAGAAGCGTCGTC 120
WSP551446 CTAATCGTTATCATGGTTATAATGATTGTATTCAACACACGTTGGGAAGAAGCGTCGTC 120
AF272980 CTAATCGTTATCATGGTTATAATGATTGTATTCAACACACGTTGGGAAGAAGCGTCGTC 120
AF173992 CTAATCGTTATCATGGTTATAATGATTGTATTCAACACACGTTGGGAAGAAGCGTCGTC 120
AF308164 CTAATCGTTATCATGGTTATAATGATTGTATTCAACACACGTTGGGAAGAAGCGTCGTC 120
AY249435 CTAATCGTTATCATGGTTATAATGATTGTATTCAACACACGTTGGGAAGAAGCGTCGTC 120
AY249436 CTAATCGTTATCATGGTTATAATGATTGTATTCAACACACGTTGGGAAGAAGCGTCGTC 120
AY249437 CTAATCGTTATCATGGTTATAATGATTGTATTCAACACACGTTGGGAAGAAGCGTCGTC 120

AY220746 GCTAATTATGATCAGATGATGCGAGTCCCAATTCAAAGAAGGGCAAAGGTAATGTCAATT 180
AX081308 GCTAATTATGATCAGATGATGCGAGTCCCAATTCAAAGAAGGGCAAAGGTAATGTCAATT 180
AY422230 GCTAATTATGATCAGATGATGCGAGTCCCAATTCAAAGAAGGGCAAAGGTAATGTCAATT 180
AF380841 GCTAATTATGATCAGATGATGCGAGTCCCAATTCAAAGAAGGGCAAAGGTAATGTCAATT 180
AX151533 GCTAATTATGATCAGATGATGCGAGTCCCAATTCAAAGAAGGGCAAAGGTAATGTCAATT 180
AX081316 GCTAATTATGATCAGATGATGCGAGTCCCAATTCAAAGAAGGGCAAAGGTAATGTCAATT 180
AY249439 GCTAATTATGATCAGATGATGCGAGTCCCAATTCAAAGAAGGGCAAAGGTAATGTCAATT 180
AY249438 GCTAATTATGATCAGATGATGCGAGTCCCAATTCAAAGAAGGGCAAAGGTAATGTCAATT 180
WSMEXICOvp26 GCTAATTATGATCAGATGATGCGAGTCCCAATTCAAAGAAGGGCAAAGGTAATGTCAATT 180
WSP551446 GCTAATTATGATCAGATGATGCGAGTCCCAATTCAAAGAAGGGCAAAGGTAATGTCAATT 180
AF272980 GCTAATTATGATCAGATGATGCGAGTCCCAATTCAAAGAAGGGCAAAGGTAATGTCAATT 180
AF173992 GCTAATTATGATCAGATGATGCGAGTCCCAATTCAAAGAAGGGCAAAGGTAATGTCAATT 180
AF308164 GCTAATTATGATCAGATGATGCGAGTCCCAATTCAAAGAAGGGCAAAGGTAATGTCAATT 180
AY249435 GCTAATTATGATCAGATGATGCGAGTCCCAATTCAAAGAAGGGCAAAGGTAATGTCAATT 180
AY249436 GCTAATTATGATCAGATGATGCGAGTCCCAATTCAAAGAAGGGCAAAGGTAATGTCAATT 180
AY249437 GCTAATTATGATCAGATGATGCGAGTCCCAATTCAAAGAAGGGCAAAGGTAATGTCAATT 180

AY220746 CGTGGAGAGAGGTCCTACAATACTCCTCTTGGAAAGGTGGCCATGAAGAATGGTCTCTCC 240
AX081308 CGTGGAGAGAGGTCCTACAATACTCCTCTTGGAAAGGTGGCCATGAAGAATGGTCTCTCC 240
AY422230 CGTGGAGAGAGGTCCTACAATACTCCTCTTGGAAAGGTGGCCATGAAGAATGGTCTCTCC 240
AF380841 CGTGGAGAGAGGTCCTACAATACTCCTCTTGGAAAGGTGGCCATGAAGAATGGTCTCTCC 240
AX151533 CGTGGAGAGAGGTCCTACAATACTCCTCTTGGAAAGGTGGCCATGAAGAATGGTCTCTCC 240
AX081316 CGTGGAGAGAGGTCCTACAATACTCCTCTTGGAAAGGTGGCCATGAAGAATGGTCTCTCC 240
AY249439 CGTGGAGAGAGGTCCTACAATACTCCTCTTGGAAAGGTGGCCATGAAGAATGGTCTCTCC 240
AY249438 CGTGGAGAGAGGTCCTACAATACTCCTCTTGGAAAGGTGGCCATGAAGAATGGTCTCTCC 240
WSMEXVP26 CGTGGAGAGAGGTCCTACAATACTCCTCTTGGAAAGGTGGCCATGAAGAATGGTCTCTCC 240
WSP551446 CGTGGAGAGAGGTCCTACAATACTCCTCTTGGAAAGGTGGCCATGAAGAATGGTCTCTCC 240
AF272980 CGTGGAGAGAGGTCCTACAATACTCCTCTTGGAAAGGTGGCCATGAAGAATGGTCTCTCC 240
AF173992 CGTGGAGAGAGGTCCTACAATACTCCTCTTGGAAAGGTGGCCATGAAGAATGGTCTCTCC 240
AF308164 CGTGGAGAGAGGTCCTACAATACTCCTCTTGGAAAGGTGGCCATGAAGAATGGTCTCTCC 240
AY249435 CGTGGAGAGAGGTCCTACAATACTCCTCTTGGAAAGGTGGCCATGAAGAATGGTCTCTCC 240
AY249436 CGTGGAGAGAGGTCCTACAATACTCCTCTTGGAAAGGTGGCCATGAAGAATGGTCTCTCC 240
AY249437 CGTGGAGAGAGGTCCTACAATACTCCTCTTGGAAAGGTGGCCATGAAGAATGGTCTCTCC 240

AY220746 GATAAGGACATGAAGGATGTTTCTGCTGATCTTGTTCATCTCTACCCTCACAGCCCCAAGG 300
AX081308 GATAAGGACATGAAGGATGTTTCTGCTGATCTTGTTCATCTCTACCCTCACAGCCCCAAGG 300
AY422230 GATAAGGACATGAAGGATGTTTCTGCTGATCTTGTTCATCTCTACCCTCACAGCCCCAAGG 300
AF380841 GATAAGGACATGAAGGATGTTTCTGCTGATCTTGTTCATCTCTACCCTCACAGCCCCAAGG 300
AX151533 GATAAGGACATGAAGGATGTTTCTGCTGATCTTGTTCATCTCTACCCTCACAGCCCCAAGG 300
AX081316 GATAAGGACATGAAGGATGTTTCTGCTGATCTTGTTCATCTCTACCCTCACAGCCCCAAGG 300
AY249439 GATAAGGACATGAAGGATGTTTCTGCTGATCTTGTTCATCTCTACCCTCACAGCCCCAAGG 300
AY249438 GATAAGGACATGAAGGATGTTTCTGCTGATCTTGTTCATCTCTACCCTCACAGCCCCAAGG 300
WSMEXIvp26 GATAAGGACATGAAGGATGTTTCTGCTGATCTTGTTCATCTCTACCCTCACAGCCCCAAGG 300
WSP551446 GATAAGGACATGAAGGATGTTTCTGCTGATCTTGTTCATCTCTACCCTCACAGCCCCAAGG 300
AF272980 GATAAGGACATGAAGGATGTTTCTGCTGATCTTGTTCATCTCTACCCTCACAGCCCCAAGG 300
AF173992 GATAAGGACATGAAGGATGTTTCTGCTGATCTTGTTCATCTCTACCCTCACAGCCCCAAGG 300
AF308164 GATAAGGACATGAAGGATGTTTCTGCTGATCTTGTTCATCTCTACCCTCACAGCCCCAAGG 300
AY249435 GATAAGGACATGAAGGATGTTTCTGCTGATCTTGTTCATCTCTACCCTCACAGCCCCAAGG 300
AY249436 GATAAGGACATGAAGGATGTTTCTGCTGATCTTGTTCATCTCTACCCTCACAGCCCCAAGG 300
AY249437 GATAAGGACATGAAGGATGTTTCTGCTGATCTTGTTCATCTCTACCCTCACAGCCCCAAGG 300

AY220746 ACTGATCCCCTGGCACTGGGGCCGAGAAGCTCTAACTATGACTTTGAAGATCCTCAACAAC 360
AX081308 ACTGATCCCCTGGCACTGGGGCCGAGAAGCTCTAACTATGACTTTGAAGATCCTCAACAAC 360
AY422230 ACTGATCCCCTGGCACTGGGGCCGAGAAGCTCTAACTATGACTTTGAAGATCCTCAACAAC 360
AF380841 ACTGATCCCCTGGCACTGGGGCCGAGAAGCTCTAACTATGACTTTGAAGATCCTCAACAAC 360
AX151533 ACTGATCCCCTGGCACTGGGGCCGAGAAGCTCTAACTATGACTTTGAAGATCCTCAACAAC 360
AX081316 ACTGATCCCCTGGCACTGGGGCCGAGAAGCTCTAACTATGACTTTGAAGATCCTCAACAAC 360



UNIVERSIDAD NACIONAL DE MÉXICO



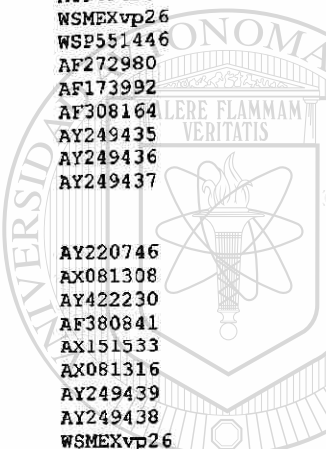
AY249439 ACTGATCCCGCTGGCACTGGGGCCGAGAAGTCTAAATGACTTTGAAGATCCTCAACAAC 360
AY249438 ACTGATCCCGCTGGCACTGGGGCCGAGAAGTCTAAATGACTTTGAAGATCCTCAACAAC 360
WSMEX1vp26 ACTGATCCCGCTGGCACTGGGGCCGAGAAGTCTAAATGACTTTGAAGATCCTCAACAAC 360
WSP551446 ACTGATCCCGCTGGCACTGGGGCCGAGAAGTCTAAATGACTTTGAAGATCCTCAACAAC 360
AF272980 ACTGATCCCGCTGGCACTGGGGCCGAGAAGTCTAAATGACTTTGAAGATCCTCAACAAC 360
AF173992 ACTGATCCCGCTGGCACTGGGGCCGAGAAGTCTAAATGACTTTGAAGATCCTCAACAAC 360
AF308164 ACTGATCCCGCTGGCACTGGGGCCGAGAAGTCTAAATGACTTTGAAGATCCTCAACAAC 360
AY249435 ACTGATCCCGCTGGCACTGGGGCCGAGAAGTCTAAATGACTTTGAAGATCCTCAACAAC 360
AY249436 ACTGATCCCGCTGGCACTGGGGCCGAGAAGTCTAAATGACTTTGAAGATCCTCAACAAC 360
AY249437 ACTGATCCCGCTGGCACTGGGGCCGAGAAGTCTAAATGACTTTGAAGATCCTCAACAAC 360

AY220746 ACTGGCGTCGATCTCTTGATCAACGACATTACTGTTCCGCCAACTGTTATTGCAGGAAAC 420
AX081308 ACTGGCGTCGATCTCTTGATCAACGACATTACTGTTCCGCCAACTGTTATTGCAGGAAAC 420
AY422230 ACTGGCGTCGATCTCTTGATCAACGACATTACTGTTCCGCCAACTGTTATTGCAGGAAAC 420
AF380841 ACTGGCGTCGATCTCTTGATCAACGACATTACTGTTCCGCCAACTGTTATTGCAGGAAAC 420
AX151533 ACTGGCGTCGATCTCTTGATCAACGACATTACTGTTCCGCCAACTGTTATTGCAGGAAAC 420
AX081316 ACTGGCGTCGATCTCTTGATCAACGACATTACTGTTCCGCCAACTGTTATTGCAGGAAAC 420
AY249439 ACTGGCGTCGATCTCTTGATCAACGACATTACTGTTCCGCCAACTGTTATTGCAGGAAAC 420
AY249438 ACTGGCGTCGATCTCTTGATCAACGACATTACTGTTCCGCCAACTGTTATTGCAGGAAAC 420
WSMEXvp26 ACTGGCGTCGATCTCTTGATCAACGACATTACTGTTCCGCCAACTGTTATTGCAGGAAAC 420
WSP551446 ACTGGCGTCGATCTCTTGATCAACGACATTACTGTTCCGCCAACTGTTATTGCAGGAAAC 420
AF272980 ACTGGCGTCGATCTCTTGATCAACGACATTACTGTTCCGCCAACTGTTATTGCAGGAAAC 420
AF173992 ACTGGCGTCGATCTCTTGATCAACGACATTACTGTTCCGCCAACTGTTATTGCAGGAAAC 420
AF308164 ACTGGCGTCGATCTCTTGATCAACGACATTACTGTTCCGCCAACTGTTATTGCAGGAAAC 420
AY249435 ACTGGCGTCGATCTCTTGATCAACGACATTACTGTTCCGCCAACTGTTATTGCAGGAAAC 420
AY249436 ACTGGCGTCGATCTCTTGATCAACGACATTACTGTTCCGCCAACTGTTATTGCAGGAAAC 420
AY249437 ACTGGCGTCGATCTCTTGATCAACGACATTACTGTTCCGCCAACTGTTATTGCAGGAAAC 420

AY220746 ATTAAGGGAATACTATGTCGAACACTTACTTCTCGAGCAAGGACATTAATCTTCATCT 480
AX081308 ATTAAGGGAATACTATGTCGAACACTTACTTCTCGAGCAAGGACATTAATCTTCATCT 480
AY422230 ATTAAGGGAATACTATGTCGAACACTTACTTCTCGAGCAAGGACATTAATCTTCATCT 480
AF380841 ATTAAGGGAATACTATGTCGAACACTTACTTCTCGAGCAAGGACATTAATCTTCATCT 480
AX151533 ATTAAGGGAATACTATGTCGAACACTTACTTCTCGAGCAAGGACATTAATCTTCATCT 480
AX081316 ATTAAGGGAATACTATGTCGAACACTTACTTCTCGAGCAAGGACATTAATCTTCATCT 480
AY249439 ATTAAGGGAATACTATGTCGAACACTTACTTCTCGAGCAAGGACATTAATCTTCATCT 480
AY249438 ATTAAGGGAATACTATGTCGAACACTTACTTCTCGAGCAAGGACATTAATCTTCATCT 480
WSMEXvp26 ATTAAGGGAATACTATGTCGAACACTTACTTCTCGAGCAAGGACATTAATCTTCATCT 480
WSP551446 ATTAAGGGAATACTATGTCGAACACTTACTTCTCGAGCAAGGACATTAATCTTCATCT 480
AF272980 ATTAAGGGAATACTATGTCGAACACTTACTTCTCGAGCAAGGACATTAATCTTCATCT 480
AF173992 ATTAAGGGAATACTATGTCGAACACTTACTTCTCGAGCAAGGACATTAATCTTCATCT 480
AF308164 ATTAAGGGAATACTATGTCGAACACTTACTTCTCGAGCAAGGACATTAATCTTCATCT 480
AY249435 ATTAAGGGAATACTATGTCGAACACTTACTTCTCGAGCAAGGACATTAATCTTCATCT 480
AY249436 ATTAAGGGAATACTATGTCGAACACTTACTTCTCGAGCAAGGACATTAATCTTCATCT 480
AY249437 ATTAAGGGAATACTATGTCGAACACTTACTTCTCGAGCAAGGACATTAATCTTCATCT 480

AY220746 TCAAAAATTACCCTCATTGACGTGTGCAGCAAATTTGAAGACGGCGCAGCCTTCGAAGCT 540
AX081308 TCAAAAATTACCCTCATTGACGTGTGCAGCAAATTTGAAGACGGCGCAGCCTTCGAAGCT 539
AY422230 TCAAAAATTACCCTCATTGACGTGTGCAGCAAATTTGAAGACGGCGCAGCCTTCGAAGCT 540
AF380841 TCAAAAATTACCCTCATTGACGTGTGCAGCAAATTTGAAGACGGCGCAGCCTTCGAAGCT 540
AX151533 TCAAAAATTACCCTCATTGACGTGTGCAGCAAATTTGAAGACGGCGCAGCCTTCGAAGCT 540
AX081316 TCAAAAATTACCCTCATTGACGTGTGCAGCAAATTTGAAGACGGCGCAGCCTTCGAAGCT 540
AY249439 TCAAAAATTACCCTCATTGACGTGTGCAGCAAATTTGAAGACGGCGCAGCCTTCGAAGCT 540
AY249438 TCAAAAATTACCCTCATTGACGTGTGCAGCAAATTTGAAGACGGCGCAGCCTTCGAAGCT 540
WSMEXvp26 TCAAAAATTACCCTCATTGACGTGTGCAGCAAATTTGAAGACGGCGCAGCCTTCGAAGCT 540
WSP551446 TCAAAAATTACCCTCATTGACGTGTGCAGCAAATTTGAAGACGGCGCAGCCTTCGAAGCT 540
AF272980 TCAAAAATTACCCTCATTGACGTGTGCAGCAAATTTGAAGACGGCGCAGCCTTCGAAGCT 540
AF173992 TCAAAAATTACCCTCATTGACGTGTGCAGCAAATTTGAAGACGGCGCAGCCTTCGAAGCT 540
AF308164 TCAAAAATTACCCTCATTGACGTGTGCAGCAAATTTGAAGACGGCGCAGCCTTCGAAGCT 540
AY249435 TCAAAAATTACCCTCATTGACGTGTGCAGCAAATTTGAAGACGGCGCAGCCTTCGAAGCT 540
AY249436 TCAAAAATTACCCTCATTGACGTGTGCAGCAAATTTGAAGACGGCGCAGCCTTCGAAGCT 540
AY249437 TCAAAAATTACCCTCATTGACGTGTGCAGCAAATTTGAAGACGGCGCAGCCTTCGAAGCT 540

AY220746 ACAATGAACATTGGATTACCTCCAGGAA 569
AX081308 ACAATGA----- 546



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AY422230	ACAATGAACATTGGATTCACCTCCAAGAA	569
AF380841	ACAATGAACATTGGATTCACCTCCAAGAA	569
AX151533	ACAATGAACATTGGATTCACCTCCAAGAA	569
AX081316	ACAATGAACATTGGATTCACCTCCAAGAA	569
AY249439	ACAATGAACATTGGATTCACCTCCAAGAA	569
AY249438	ACAATGAACATTGGATTCACCTCCAAGAA	569
WSMEXvp26	ACAATGAACATTGGATTCACCTCCAAGAA	569
WSP551446	ACAATGAACATTGGATTCACCTCCAAGAA	569
AF272980	ACAATGAACATTGGATTCACCTCCAAGAA	569
AF173992	ACAATGAACATTGGATTCACCTCCAAGAA	569
AF308164	ACAATGAACATTGGATTCACCTCCAAGAA	569
AY249435	ACAATGAACATTGGATTCACCTCCAAGAA	569
AY249436	ACAATGAACATTGGATTCACCTCCAAGAA	569
AY249437	ACAATGAACATTGGATTCACCTCCAAGAA	569

Fig. 30. Alineación múltiple de secuencias homólogas a VP26 obtenidas por medio del BLAST y ClustaW, donde se representan la sustitución y delección en los aislados WSP551446 y AX081308.

En el análisis Clustal W se determinaron que en dos secuencias de aislados de WSSV existían sustituciones o delecciones, en la posición 336 una sustitución de T → C de WSP551446 y en la posición 524, una delección de G en el aislado AX081308 sin referencia de ubicación geográfica.

13d. Análisis filogenético de secuencias del gene vp26

Las secuencias analizadas con MEGA, agrupan dos cluster 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 Fig. 31.

En el segundo grupo filogenético se encuentra el aislado de Japón, PW109340 (AX081316, PAT W00109340) y otras secuencias sin referencia geográfica. Un aislado no relacionado en ambos grupos, con el No. de acceso AX151533 (PA XU), citado como una patente de Xu y cols., emerge solo, de una rama filogenética separada, según el análisis realizado.

El análisis tipo "bootstrap" con 1000 reposiciones, en cada rama indica valores de 66 a 69, indicando una confianza estadística escasamente informativa. Aun variando los parámetros de reposiciones y remuestreos, no se logró aumentar el nivel de bootstrap. Las secuencias con homología del 99%, DINH (WSP551446) y

VP26 (AY220746) se sitúan en ramas evolutivas diferentes, como se observa en la Fig. 31.

CLADOGRAMA DE vp26

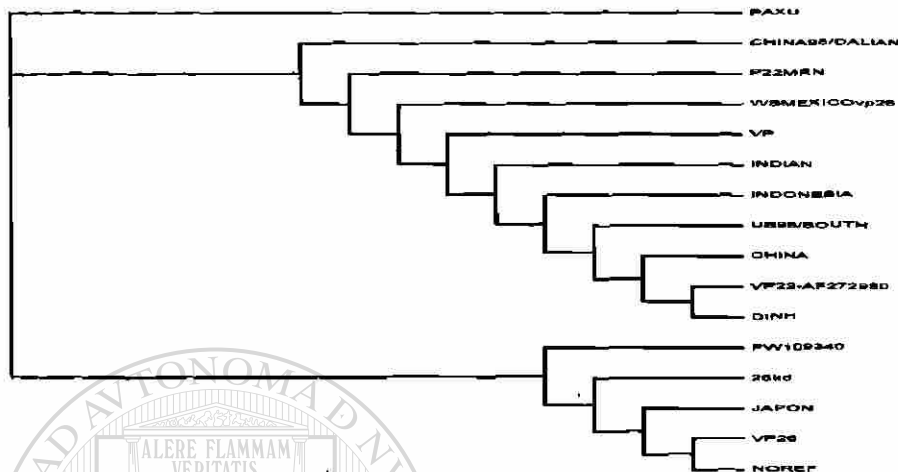


Fig. 31. Árbol filogenético de vp26. La predicción evolutiva con el método bootstrap, predice tres ramas evolutivas. La secuencia del aislado mexicano se relaciona filogenéticamente con los aislados de China, India, Indonesia y US98/South Carolina.

13e. Análisis de alineación múltiple de secuencias de proteínas homólogas a VP26.

El análisis de homología, mostró similitud del 100 % con la mayoría de las secuencias de VP26 del aislado mexicano del virus WSSV con AF272980 (Q9ICG6), AF173992, AF308164, AF308164 P22 mRNA, AY249435 (China95/Dalian), AY249436 (China 99/Qindao), AY249437 (US98/SouthCarolina), AY249438 (Japan98), AY249439 (Indonesia 97), AX081316 (WO0109340), AF380841, AY422230, AY220746.

La proteína (VP) tiene como sinónimos registrados vp26, VP22, VP26, p22, ORF153, WSSV 367 Wsv311 (NCBI Tax ID 92652).

Los números de acceso al banco de genes EMBL, identificación de la proteína son AF272980; AAF82366.1; AF173992; AAF29806.1; AF308164; AAL09430.1; AF332093; AAL33313.1; AF369029; AAK77822.1; AF369029; AAK77822.1;

CLADOGRAMA DE LA PROTEINA VP26

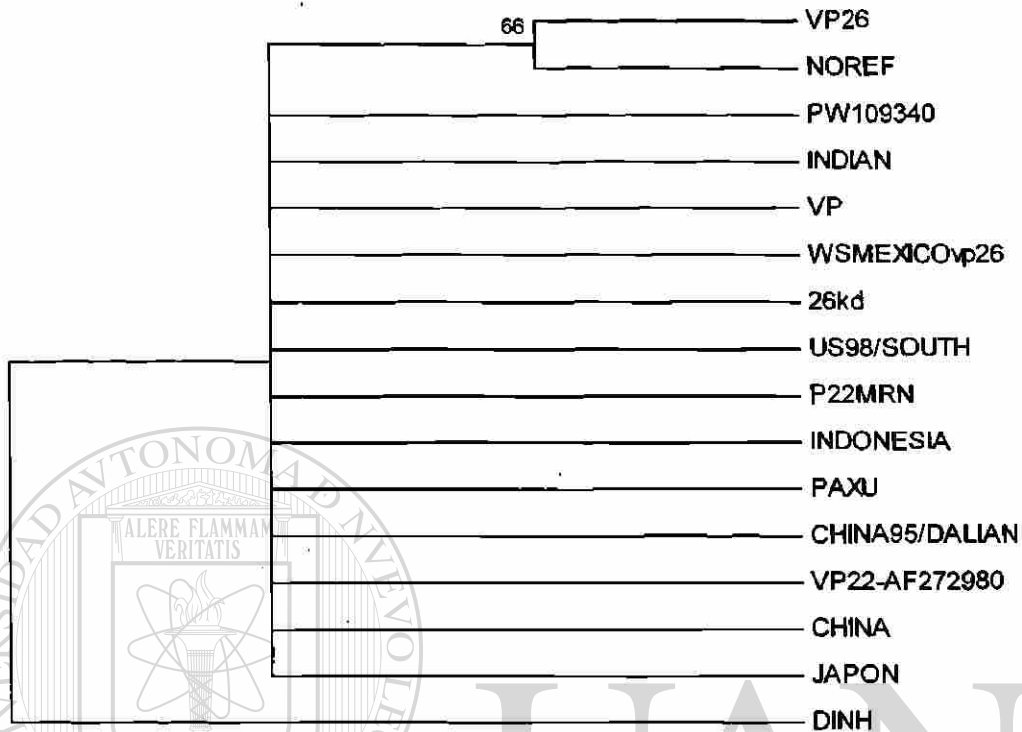


Fig. 33. Árbol filogenético de VP26. El programa MEGA, con 1000 reposiciones, predice un ancestro evolutivo para el aislado mexicano, indio, americano, indonesio, chino y japonés, con valores de bootstrap inferiores a los límites confiables por lo cual no es completamente informativo.

14 Análisis del gene vp19

14a. Secuenciación del gene vp 19:

El análisis de la secuencia y traducción del fragmento de la vp19, indica que este, está constituido por 363pb lo que constituye a 120 aminoácidos, en el cual inicia con una poliadenilación e inmediatamente el codon de inicio. El peso molecular teórico es de 13114, y el punto isoeléctrico es ácido, de 4.36 con una hidrofobicidad de -0.253333

Este fragmento codifica a 363pb para una proteína de 120 aminoácidos del marco de lectura +3 como se muestra en la Fig. 34.

GCC TCC TCT TGG GGT AAG ACA TAA AAA CGG TGG CGG CGG AAA CGA GGA ACA GAA
 GAG CGG ACC CAG CCA GAA GCA TCA TAT CCC TGG TCC TGT TCT TAT ATT TGT CCT
 CAT CAT CGT TAT CGT TGG CAG TGT CGT CAT CAT CAA CGG TGT CCT TAT CAG TGT
 CAG AAT CGC TGT CCT TCT TTG GTC CCA TCC ATA CAT TCA TGA CGG CCA GGA CGA
 GGA TAC CAA TTG AGA TAG CAA CGA TCA AAA AGA GAC CCA TGC GAG CCA TAG ACA
 TGG AGC CTT CAA GAT CTT CCA TGG TGT AAG AAG GGC CAG CGG CCT GGG CTC CGG
 TCC TGC CGA AAG GAAGA GTG TTA GTC GTG GTG GCC ATT T

REVERSO COMPLEMENTO

AAATGGCCACCACGACTAACAACCTCTTCCCTTTTCGGCAGGACCGGAGCCAGGCCCGCTGGCC
 CTTCTTACACCATGGAAGATCTTGAAGGCTCCATGTCTATGGCTCGCATGGGTCTCTTTT
 TGATCGTTGCTATCTCAATTGGTATCCTCGTCTCGGCCGTCATGAATGTATGGATGGGAC
 CAAAGAAGGACAGCGATTCTGACACTGATAAGGACACCGATGATGATGACGACACTGCCA
 ACGATAACGATGATGAGGACAAATATAAGAACAGGACCAGGGATATGATGCTTCTGGCTG
 GGTCCGCTCTTCTGTTCCCTCGTTTCCGCCGCCACCGTTTTTATGTCTTACCCCAAGAGGAGG
 C

Fig. 34. Secuencia amplificada con los primers VP19F y R del aislado viral WSSV. El fragmento analizado es de 363 pb.

El fragmento de 363 pb codifica para una proteína de 120 aminoácidos

aaatggccaaccacgactaacactcttctcttcggcaggaccggagcccaggccgctggccct
 M A T T T N T L P F G R T G A Q A A G P
 tcttacaccatggaagatcttgaaggctccatgtctatggctcgcacatgggtctctttttg
 S Y T M E D L E G S M S M A R M G L F L
 atcgttgctatctcaattggatctctcgtcctggccgctcatgaatgtatggatgggacca
 I V A I S I G I L V L A V M N V W M G P
 aagaaggacagcgattctgacactgataaggacaccgatgatgatgacgacactgccaac
 K K D S D S D T D K D T D D D D D T A N
 gataacgatgatgaggacaaatataagaacaggaccagggatgatgatgcttctggctggg
 D N D D E D K Y K N R T R D M M L L A G
 tccgctcttctgltctcgtttccgcccgcaccggtttttatgtcttaccccaagaggagge
 S A L L F L V S A A T V F M S Y P K R R

Fig. 35. Traducción de vp 19 en el marco de lectura +3 para el fragmento vp19 de 363 pb.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

14b. Análisis de hidrofobicidad

El perfil hidropático de vp19 indica dos regiones transmembranales, con el siguiente índice, como se muestra en la Fig. 36.

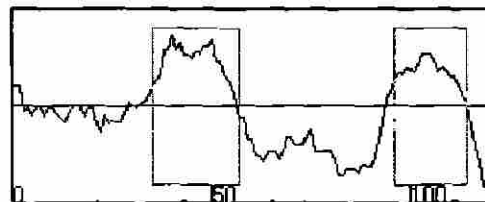


Fig. 36. Gráfica del perfil de hidrofobicidad de la proteína VP 19 del fragmento amplificado y clonado del aislado WSSV de México,

Las regiones hidrofóbicas quedarían situadas de la región 35 del extremo N terminal (R), a la posición 57 C terminal (W) y de la posición 96 (M) a 114 (M) en los extremos N y C-terminal respectivamente.

La secuencia de las dos hélices transmembranales se detalla en la Fig. 37 a y 37 b.

No	N terminal	Región transmembranal	C Terminal	Tipo	Long
1	35	RMGLFLIVAISIGILVLAVMNW	57	Primaria	23
2	96	MLLAGSALLFLVSAATVFM	114	Primaria	19

Fig. 37 a. Regiones transmembranales de VP19 del aislado mexicano de WSSV.



Fig. 37b. Modelo de las dos regiones transmembranales de VP 19. El orden de los aminoácidos de las hélices hidrofóbicas, de acuerdo al programa SOSUI.

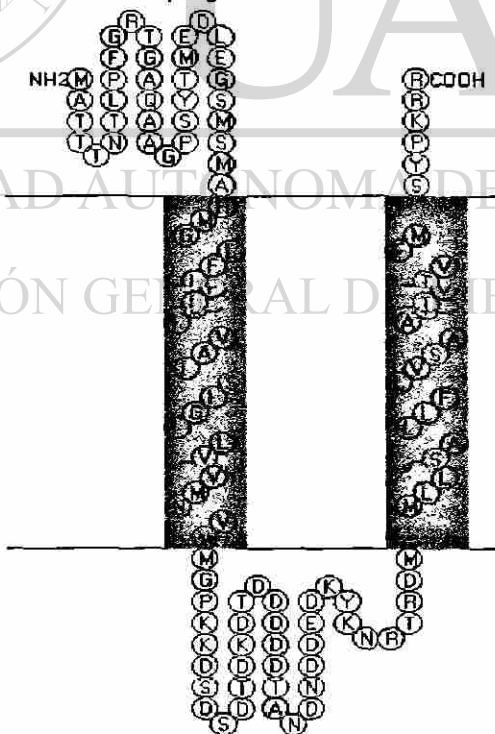


Fig. 38. Modelo de la ubicación de las dos regiones transmembranales para el gene de la vp19.

La posición de las dos regiones transmembranales, se situaría en la región hidrofóbica de acuerdo al modelo del programa SOSUI representado en la Fig. 38.

14c. Análisis de alineación múltiple de secuencias homologas a vp19.

La búsqueda en bancos de datos de homología de secuencias (BLAST), reveló la presencia de varias VP 19 similares a la del fragmento de 363pb (VP19), todas ellas perteneciente al virus WSSV de diferentes regiones geográficas. Estas secuencias se compraron utilizando el programa ClustalW (Fig. 39).

Las secuencias homólogas con el fragmento amplificado y clonado fueron Taiwán (AF440570); Vietnam (AY160771), Indonesia 97 (AY249448), Japón 98 (AY249447), Aislado de EUA98/SUR Carolina (AY249446), Aislado de China 99/Qindao (AY249445), Aislado de China 95/Dalian (AY249444), Tailandia (AF369029), China (AF332093), Korea 01 (AY316119), China 02 (AY220744), Singapore (AF402997) e India (AY422227). La Fig. 39 detalla el análisis Clustal W de la alineación múltiple donde se muestra la similitud entre las secuencias homólogas.

CLUSTALW (1.82) ALINEACION MULTIPLE DE VP19

México	AAATGGCCACCACGACTAACACTCTTCTTTTCGGCAGGACCGGAGCCAGGCCGCTGGCC	60
Indonesia	AAATGGCCACCACGACTAACACTCTTCTTTTCGGCAGGACCGGAGCCAGGCCGCTGGCC	60
Taiwan	AAATGGCCACCACGACTAACACTCTTCTTTTCGGCAGGACCGGAGCCAGGCCGCTGGCC	60
China	--ATGGCCACCACGACTAACACTCTTCTTTTCGGCAGGACCGGAGCCAGGCCGCTGGCC	58
Singapore	--ATGGCCACCACGACTAACACTCTTCTTTTCGGCAGGACCGGAGCCAGGCCGCTGGCC	58
Korea	--ATGGCCACCACGACTAACACTCTTCTTTTCGGCAGGACCGGAGCCAGGCCGCTGGTC	58
India	--ATGGCCACCACGACTAACACTCTTCTTTTCGGCAGGACCGGAGCCAGGCCGCTGGCC	58

México	CTTCTTACACCATGGAAGATCTTGAAGGCTCCATGTCTATGGCTCGCATGGGTCTCTTTT	120
Indonesia	CTTCTTACACCATGGAAGATCTTGAAGGCTCCATGTCTATGGCTCGCATGGGTCTCTTTT	120
Taiwan	CTTCTTACACCATGGAAGATCTTGAAGGCTCCATGTCTATGGCTCGCATGGGTCTCTTTT	120
China	CTTCTTACACCATGGAAGATCTTGAAGGCTCCATGTCTATGGCTCGCATGGGTCTCTTTT	118
Singapore	CTTCTTACACCATGGAAGATCTTGAAGGCTCCATGTCTATGGCTCGCATGGGTCTCTTTT	118
Korea	CTTCTTACACCATGGAAGATCTTGAAGGCTCCATGTCTATGGCTCGCATGGGTCTCTTTT	118
India	CTTCTTACACCATGGAAGATCTTGAAGGCTCCATGTCTATGGCTCGCATGGGTCTCTTTT	118

México	TGATCGTTCGCTATCTCAATTGGTATCCTCGTCCTGGCCGTCATGAATGTATGGATGGGAC	180
Indonesia	TGATCGTTCGCTATCTCAATTGGTATCCTCGTCCTGGCCGTCATGAATGTATGGATGGGAC	180
Taiwan	TGATCGTTCGCTATCTCAATTGGTATCCTCGTCCTGGCCGTCATGAATGTATGGATGGGAC	180
China	TGATCGTTCGCTATCTCAATTGGTATCCTCGTCCTGGCCGTCATGAATGTATGGATGGGAC	178

Singapore	TGATCGTTGCTATCTCAATTGGTATCCTCGTCCTGGCCGTCATGAATGTATGGATGGGAC	178
Korea	TGATCGTTGCTATCTCAATTGGTATCCTCGTCCTGGCCGTCATGAATGTATGGATGGGAC	178
India	TGATCGTTGCTATCTCAATTGGTATCCTCGTCCTGGCCGTCATGAATGTATGGATGGGAC	178

México	CAAAGAAGGACAGCGATTCTGACACTGATAAGGACACCGATGATGATGACGACACTGCCA	240
Indonesia	CAAAGAAGGACAGCGATTCTGACACTGATAAGGACACCGATGATGATGACGACACTGCCA	240
Taiwán	CAAAGAAGGACAGCGATTCTGACACTGATAAGGACACCGATGATGATGACGACACTGCCA	240
China	CAAAGAAGGACAGCGATTCTGACACTGATAAGGACACCGATGATGATGACGACACTGCCA	238
Singapore	CAAAGAAGGACAGCGATTCTGACACTGATAAGGACACCGATGATGATGACGACACTGCCA	238
Korea	CAAAGAAGGACAGCGATTCTGACACTGATAAGGACACCGATGATGATGACGACACTGCCA	238
India	CAAAGAAGGACAGCGATTCTGACACTGATAAGGACACCGATGATGATGACGACACTGCCA	238

México	ACGATAACGATGATGAGGACAAATATAAGAACAGGACCAGGGATATGATGCTTCTGGCTG	300
Indonesia	ACGATAACGATGATGAGGACAAATATAAGAACAGGACCAGGGATATGATGCTTCTGGCTG	300
Taiwan	ACGATAACGATGATGAGGACAAATATAAGAACAGGACCAGGGATATGATGCTTCTGGCTG	300
China	ACGATAACGATGATGAGGACAAATATAAGAACAGGACCAGGGATATGATGCTTCTGGCTG	298
Singapore	ACGATAACGATGATGAGGACAAATATAAGAACAGGACCAGGGATATGATGCTTCTGGCTG	298
Korea	ACGATAACGATGATGAGGACAAATATAAGAACAGGACCAGGGATATGATGCTTCTGGCTG	298
India	ACGATAACGATGATGAGGACAAATATAAGAACAGGACCAGGGATATGATGCTTCTGGCTG	298

México	GGTCCGCTCTTCTGTTCCCTCGTTTCCGCCGCCACCGTTTTTATGTCTTACCCCAAGAGGA	360
Indonesia	GGTCCGCTCTTCTGTTCCCTCGTTTCCGCCGCCACCGTTTTTATGTCTTACCCCAAGAGGA	360
Taiwan	GGTCCGCTCTTCTGTTCCCTCGTTTCCGCCGCCACCGTTTTTATGTCTTACCCCAAGAGGA	360
China	GGTCCGCTCTTCTGTTCCCTCGTTTCCGCCGCCACCGTTTTTATGTCTTACCCCAAGAGGA	358
Singapore	GGTCCGCTCTTCTGTTCCCTCGTTTCCGCCGCCACCGTTTTTATGTCTTACCCCAAGAGGA	358
Korea	GGTCCGCTCTTCTGTTCCCTCGTTTCCGCCGCCACCGTTTTTATGTCTTACCCCAAGAGGA	358
India	GGTCCGCTCTTCTGTTCCCTCGTTTCCGCCGCCACCGTTTTTATGTCTTACCCCAAGAGGA	358

México	GGC	363
Indonesia	GGC	363
Taiwan	GGC	363
China	GGC	361
Singapore	GGC	361
Korea	GGC	361
India	GGC	361

(China:0.00277,Singapore:0.00277,(Korea:0.00277,(India:0.00554,(Taiwan:0,(México:0,Indonesia:0.00276):0):0):0);		

Fig. 39. Alineación Clustal W (1.82) de alineación múltiple, para la comparación de secuencias nucleotídicas del gene vp19 de varias regiones geográficas (Se cita a continuación la secuencia y la clave de acceso en el GenBank/EMBL. Fig. 39).

Las secuencias con 100 % de homología fueron AF440570.1 (Taiwán); AY160771.1 (Vietnam); con el 99 % fueron AY249448.2 (Indonesia 97), AY249447.1 (Japón 98), AY249446.1 (US98/S Carolina), AY249445.1 (China99/Qindao), AY249444.1 (China95/Dalian), AF332093.1 (China),

AF369029.1 (Tailandia), AY316119.1 (Korea 01), AY220744.1 (China 02), AF402997.1 (Singapore) y AY422227.1 (India).

China, Singapore, Korea e India, no presentaron las dos primeras A de la secuencia, difiriendo también, en la sustitución de C → T en el nucleótido 28 y 46 en el fragmento del aislado de la India. En el nucleótido 198/196, la sustitución fue de T → C; en la posición 214/212 A → T en el aislado de China y 220/218 en los aislados de Indonesia. En el aislado de Korea, la C → T en el nt 59/57.

14d. 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. Este 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 Fig. 40.

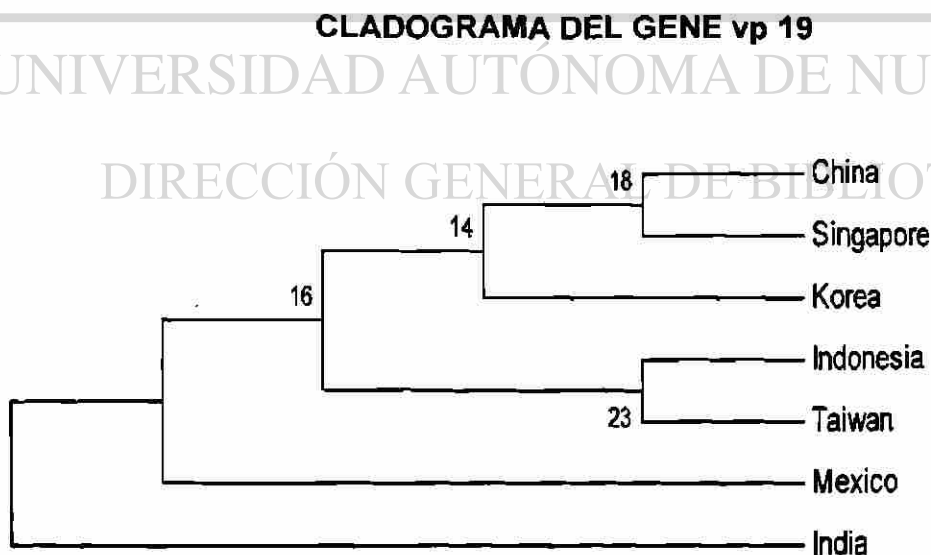


Fig. 40. Árbol filogenético de las secuencias homólogas a vp 19, de acuerdo a la predicción del programa MEGA, basado en el tipo de análisis “bootstrap” con 1000 reposiciones.

14e. Análisis de alineación múltiple de secuencias de proteínas homólogas a VP19.

En cuanto al análisis de proteínas se realizó un Clustal W (Fig.41) para el gene de la vp19, a continuación se cita las secuencias de proteínas para las siguientes regiones geográficas:

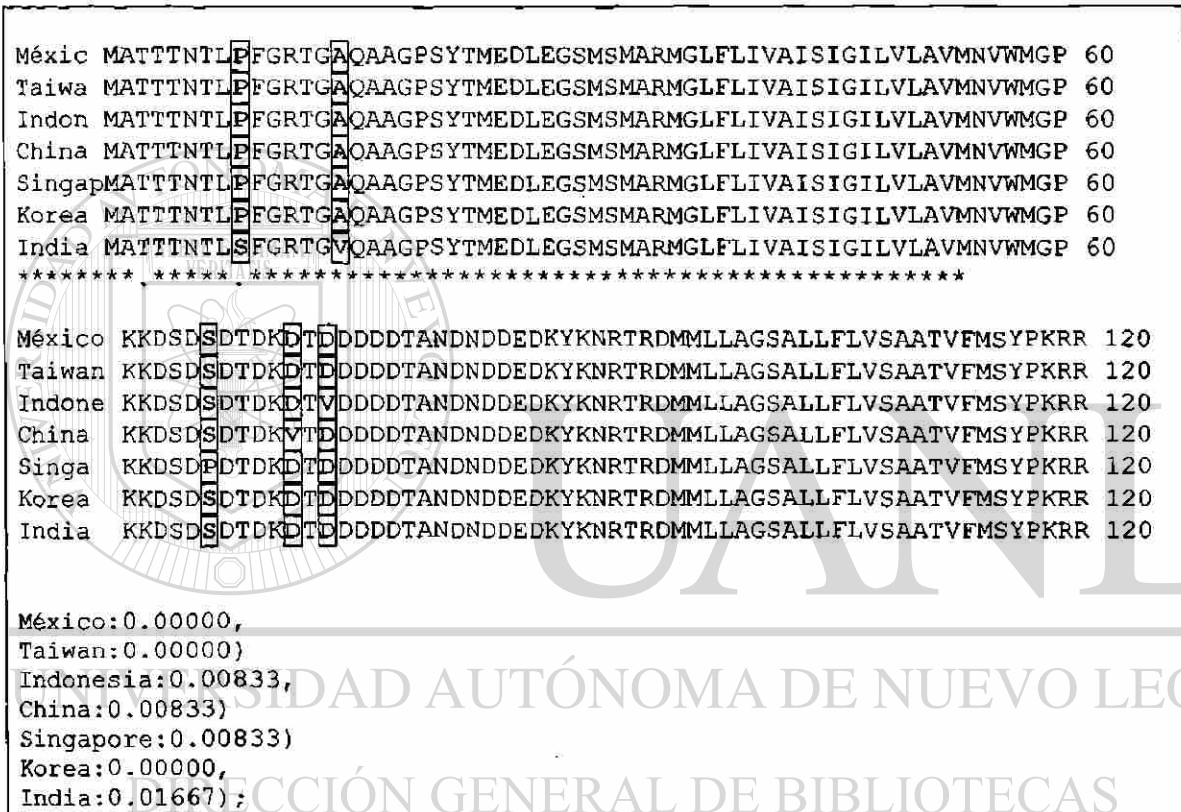


Fig. 41. Análisis de alineación múltiple de secuencias homólogas para la proteína VP 19. Con borde se señala la hilera de nucleótidos con sustituciones de los aislados geográficos reportados en los bancos de genes.

El análisis de esta comparación mostró que existen diferencias en donde se substituyen aminoácidos en las secuencias reportadas. Con dos substituciones se presentó el aislado de la India en la cual sustituye una P (Prolina) → S(Serina) en el noveno aminoácido y en el aminoácido 15 substituyen una A(Alanina)→ V(Valina), con una substitución esta: Singapur sustituye una S (Serina) →P (Prolina) en el aminoácido 66, China e Indonesia que substituyen una D (Ac.

Aspártico) →V (Valina) en el aminoácido 71 y 73 respectivamente. El aislado de Taiwán, Indonesia y México provienen de una misma rama filogenética, tal como se presenta en la Fig. 42.

CLADOGRAMA DE LA PROTEINA VP19

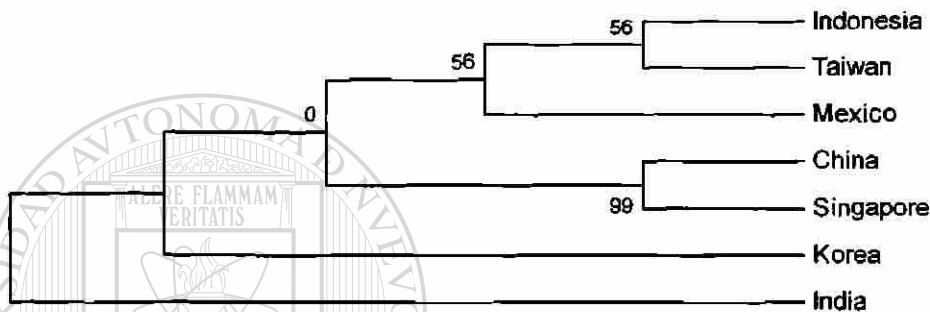


Fig.42. Árbol filogenético basado en CLUSTAL W con el programa MEGA de la secuencia de aminoácidos de VP19.

15. Expresión del gene vp 28:

Una vez que se obtuvo la secuencia del fragmento de DNA correspondiente al gene que codifica para la proteína VP 28, se liberó del plásmido pMOS-VP28 y se subclonó en el vector de expresión PGEX5X-1, ya que ambos tanto el inserto como el vector presentan el mismo marco de lectura, obteniéndose el plásmido pGEX5X1-VP28. Con este plásmido se transformaron bacterias *E. coli* DH-5 α , y de las bacterias transformantes se seleccionaron varias clonas con el fin de inducir el péptido recombinante GST-VP28. La inducción se monitoreó por inmunotransferencia utilizando un suero de ratón anti-GST (Fig. 43).

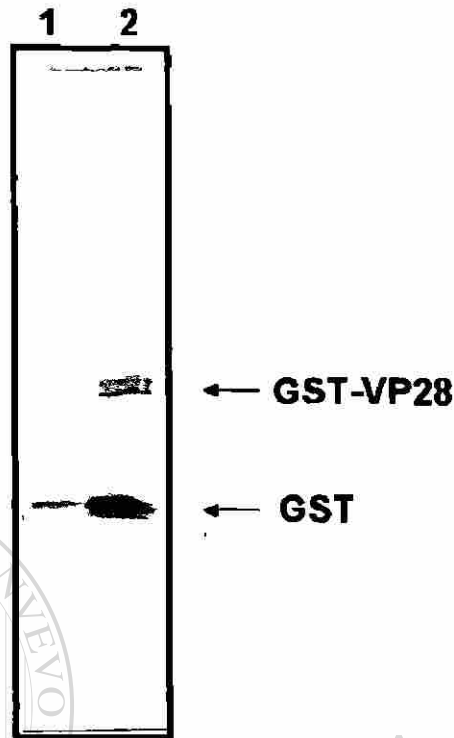
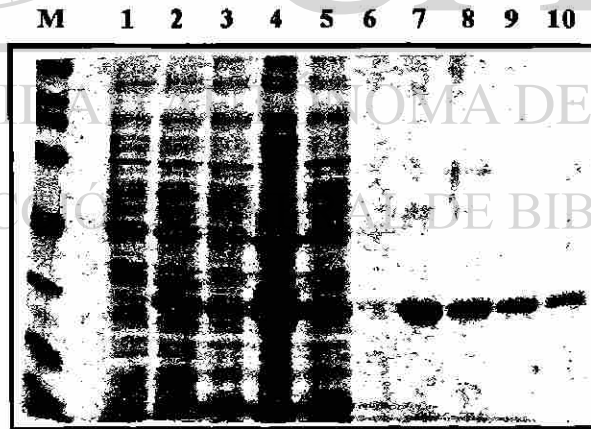


Fig. 43 a. Inducción de GST-VP28. Extracto totales de bacterias (*E. coli* DH-5 α transformadas con el plásmido pGEX5x1-VP28) sin inducir (1) e inducidas con IPTG (2), se ensayaron por inmunotransferencia con anticuerpos anti-GST.

Fig. 43 b. Purificación de la proteína de fusión GST-VP28. Análisis por SDS-PAGE al 10% de (1)



bacterias no inducidas, (2) bacterias inducidas con IPTG, (3) sobrenadante (4) pastilla, (5) material no unido a gultación-sepharosa, (7-10) material unido a la resina y eluido con glutatión reducido.

Después de confirmar que se induce la expresión de la proteína recombinante, se procedió a su purificación por columnas de afinidad. Para ello extractos totales de bacterias inducidas se pasaron por una columna glutatión-sepharosa y la proteína

unida se eluyó con glutatión reducido (Fig. 43 b). Se puede apreciar que el método de solubilización no fue el adecuado, ya que en el material insoluble aún se detecta tanto GST como GST-VP28. Por otro lado, la recuperación de la proteína de fusión es baja, aún a pesar de que se detecta gran cantidad de GST. Posiblemente el inserto VP28 dentro del plásmido sea inestable y este siendo abortado. También se observan dos bandas de proteína en la zona en donde migra la proteína GST-VP28, así como en la zona de GST, lo que sugiere que la proteína de fusión esté sufriendo un proceso de degradación.

Con el fin de obtener anticuerpos anti-GST-VP28, la proteína recombinante se purificó por electroelución, y el material obtenido se analizó por SDS-PAGE al 10% (Fig. 43 c).

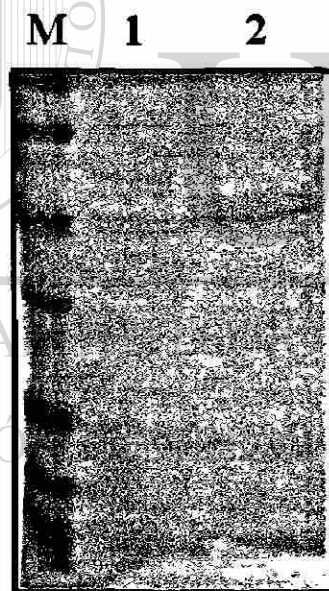


Fig. 43 c. Análisis por SDS-PAGE al 10% del material electroeluido a partir del material unido a la columna de afinidad de Glutatión-Sepharosa (M) marcadores de peso molecular (2-3) fracciones del material electroeluido de acuerdo a su colecta en la cámara de electroelución

Con este método se logró purificar la proteína recombinante para inducir anticuerpos contra ella y realizar próximos ensayos de inmunoprotección.

VIII. DISCUSIONES

El WSSV, es causado por un virus devastador que afecta a un amplio número de hospederos acuáticos, particularmente camarones peneidos. El genoma de WSSV es alrededor de 300 kb (van Hulten y cols., 2001b; AF440570) y es de los genomas virales más grandes donde se han identificado 184 marcos de lectura, de los cuales, cinco de ellos codifican a las proteínas estructurales mayores de la envoltura y cápside (van Hulten y cols., 2000a, c; 2001a; 2002).

Con respecto a su ubicación taxonómica del WSSV, primero fue asignado como Baculoviridae (Francki y cols., 1991). Actualmente el WSSV, no es aceptado como familia de los baculovirus (Murphy et al., 1995) porque la talla de su DNA es mayor a 200 kb y carece homología genética significativa con los baculovirus. Según la información colectiva obtenida, van Hulten y cols., (2001b, 2002); proponen a revisión que WSSV podría ser un género representativo *Whispovirus* o incluso, una nueva familia, *Whispoviridae*.

Actualmente se conoce que el virus de WSSV tiene un genoma de 305 kb (van Hulten y cols., 2001b), y en un análisis de éste, reportan 181 marcos de lectura abierta (ORFs), donde algunos ORFs son similares a genes virales y otros, a genes eucarióticos, pero la mayoría codifica a proteínas putativas sin homología a alguna proteína conocida (Yang y cols., 2001). Por tanto, proponen una nueva familia *Nimaviridae* y un nuevo genero *Whispovirus* , reconocido por el Comité Internacional de Taxonomía Viral (Vlak y cols., 2002).

Con base en estos datos y por ser un patógeno de efectos devastadores en México, nos propusimos purificar y caracterizar al WSSV, enfocándonos en las proteínas que conforman la cápside y nucleocápside, por PCR, clonar los marcos de lectura abierta y realizar un análisis de homología filogenético de virus, enfocar los experimentos de la electroelusión específicamente en la proteína VP28.

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 esta totalmente formada, en un extremo se observa la forma de aro o anillo, con una prolongación en forma de tubo en las cuales están localizados los cores en arreglos paralelos reflejando una segmentación superficial, cubiertos por una membrana. La forma de la estructura se asemeja a un barril o bastón, con una longitud media de 150 nm. El tamaño de la nucleocápside es de los más grandes reportados en las cepas estudiadas a la actualidad, comparados con los descritos por Nadala y cols (1998) quienes describen al 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 y cols. (1997) reportan a la nucleocápside con extremos asimétricos uno redondo y otro en forma cuadrada, con una apariencia superficialmente segmentada, y con un extremo en forma de aro, además menciona que estas características asimétricas no han sido reportadas en el virus del síndrome de la mancha blanca, sino que es una característica de los baculoviridae (clasificación anterior) y que ha sido observada en los baculovirus no ocluidos, Baculo-B y RV-CM (Johnson, 1988).

La descripción viral antes mencionada es similar a la observada en los camarones infectados naturalmente del Pacífico Mexicano. Además de observar los virus en forma de barril o bastón y con asimetría en los extremos (un extremo con forma de un aro y otro asimétrico), en nuestras observaciones, encontramos una variante en la nucleocápside la cual se observa con ambos extremos redondos en forma de anillo, unidos por un cilindro que son de tamaño mucho más grandes de la nucleocápside normal, con una media de 207.97. Estas formas estructurales se observaron en granjas que habían tenido de 2 a 3 epizootias consecutivas.

Wang y cols. (2000) reportan en diferentes aislados geográficos partículas virales en forma de barril o bastón con y sin cauda, considerándolo como un complejo estructural de proteínas. En este estudio, observamos la forma de barril en aislados de las granjas camaronícolas de la costa de del estado de Nayarit, en el

estado de Sinaloa, la forma estructural del virus va de ovoide a completamente redonda.

Por las diferencias ultraestructurales de varios aislados del Pacífico Mexicano, suponemos que se debe a la misma morfogénesis del virus de la mancha blanca, que empieza con la formación del tubo segmentado largo y que éste se fragmenta en más cortos que serán los precursores de la nucleocápside ovoide a redonda cubierta con membranas de novo, que proliferan de la membrana nuclear o puntos de contacto entre membranas intranucleares como señalan Durand y cols. (1997).

Por otra parte, el análisis de los purificados virales por geles de poliacrilamida al 12% mostró la presencia de cuatro prominentes bandas proteínicas cuyos pesos moleculares revelados fueron de 28, 26, 19 y 15 kDa estas se encontraron presentes en el purificado viral de las cuatro muestras estudiadas. Estos purificados fueron tratados previamente con buffer NP-40 1% como lo realizó van Hulten (2000a, b). Las pesos moleculares de las proteínas del virión fueron similares a las reportadas por Nadala y cols. (1998) y Wang y cols. (2000), la diferencia radica en el número de bandas encontradas, ellos encontraron proteínas de tallas que van de 14.5 a 27.5 kDa. Nadala y cols. (1998), por ejemplo, de las proteínas que reporta dos son de 19 y 27.5 respectivamente que bien se podrían tratar de la proteína de 19 y de 28 kDa encontradas en este virión. Sin embargo los trabajos de investigación con el que concuerdan los resultados son los de van Hulten y cols. (2001a, b) quien señala la presencia de cinco proteínas estructurales la VP28, VP26, VP24, VP19 y VP15 con tallas de 28, 26, 24, 19 y 15 kDa respectivamente, donde la VP28, y VP19 se asocia con la envoltura del virión y la VP 26, VP24 y VP15 se asocian con la nucleocápside.

La identificación como proteínas pertenecientes al virus WSSV, de estas bandas en el gel de SDS-PAGE fue confirmado por el análisis de Western blot usando anticuerpos policlonales contra el virus. Estas proteínas juegan un papel muy importante en el proceso de infección y desarrollo de la enfermedad de mancha

blanca en los camarones peneidos.

Yang y cols. (2001) demostraron que las proteínas de WSBV esta relacionado a genes eucarióticos más que a los mismos genes virales. En un análisis de secuencia indica que WSSV difiere a todos los virus conocidos y quizá se les pudiera relacionar con algunos genes de los herpesvirus, pero se diferenciarían en cuanto a morfología ya que WSBV tiene un genoma de DNA con doble cadena circular y los herpesvirus, contienen una cápside icosaédrica de doble cadena lineal.

En cuanto a la relación morfológica con otros virus, tienen alguna similitud a los baculovirus de los insectos solo que en éstos, no se detecta una homología en la secuencia de aminoácidos, por lo que sugieren que WSBV representa una nueva familia de virus o quizá representan una escala evolutiva significativa entre los virus terrestres y marinos (Yang y cols., 2001).

Actualmente el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, Vlak y cols., 2002) coloca a este virus en la familia Nimaviridae del género *Whispovirus*, donde la palabra Nima se refiere al tallo o extensiones polares de la partícula viral y filogenéticamente distintos a otros virus de DNA largos, *Whispovirus*: por que se asemeja en cuanto a morfología en algunos aspectos a los baculovirus pero genéticamente sin relación a la forma de varilla de los virus *Oryctes*.

En lo que respecta a los marcos de lectura abierta obtuvimos cuatro de los cinco genes descritos por van Hulten y cols. (2000 b, 2001a; vp28, vp26, vp19 y vp15), los cuales se les considera importantes en cuanto al daño patológico que causa al camarón, si se compara la evolución de los genes asiáticos con los mexicanos, se puede asumir que también evolucionaron de un gene que se duplicó y subsecuente mente se separaron, en estas mismas proteínas y tuvieron funciones diferentes en el virus de WSSV, y estos fueron asignados a 10 familias de genes (van Hulten y cols., 2002), lo que es posible; ya que los eventos de duplicación de

genes puede ser tanto en virus que presenten genoma de RNA (Boyko y cols.,1992), como virus de DNA muy largo, estos tipos de virus pueden jugar un papel muy importante en la co-evolución entre el virus y el hospedero en respuesta a la presión selectiva (Davison, 1999). Lo mismo considera Huang y cols. (2002) al describir al gene vp281 como una proteína estructural nueva de WSSV en cuanto a los niveles de aminoácidos y nucleótidos, concuerda con van Hulten y cols.,(2002) en que podría ser que esta proteína haya evolucionado por la duplicación de un gene y que tienen un gene ancestral común.

Los dominios transmembranales se localizaron en 2 proteínas, siendo estas las VP26 y VP19. La proteína VP26 presenta una conformación hélice β , cuya longitud transmembranal es de 23 aa, el extremo 9 N-terminal se localiza el aminoácido A(Alanina) y en el 31 C-Terminal F(Fenilalanina) además de ser una proteína con un punto isoeléctrico ácido. Para la VP19 se encontraron dos dominios transmembranales, en la región 35 y 96 N-Terminal (R y M) y el otro en la región 57 y 114 C-Terminal (W y M) respectivamente en el marco de lectura abierta del aislado mexicano, lo cual sugiere que podría ser un puente entre la envoltura del virión. van Hulten y cols. (2002) señalan también estas dos regiones transmembranales, una en el aminoácido 37 hasta el 59 y la segunda en el 95 al 117 aminoácido. Estos dominios hidrofóbicos pueden estar involucrados en la interacción proteína-proteína, los cuales son necesarios para la formación de la nucleocápside en la cual consiste en subunidades globulares que además sirve de anclaje de esta proteína a la envoltura en el WSSV (van Hulten y cols. 2001a)..

Las proteínas que no presentaron regiones transmembranales fueron la VP28 y VP15, ambas fueron proteína solubles. Para la VP28 que esta constituida por 172aa, nos revela que no tiene el péptido señal, debido a que inicia a 32aa río abajo del marco de lectura como lo reporta Zhang y cols (2002), donde el gene vp28 presenta 204aa e inicia con la Metionina lo que favorece al contexto de Kozak. Para la VP15 de 71aa nos revela en su marco de lectura +2, a una proteína altamente soluble sin regiones polares, como la reporta también van Hulten y cols

(2002) mencionan que la VP 15 carece de regiones hidrofóbicas, pero que es una proteína con carga fuertemente positiva a todo lo largo de la longitud del polipéptido, y una función de esta proteína altamente básica es que funciona como histona, como una proteína que se asocia al DNA. Marks y cols. (2003) detectaron seis mRNA's tardíos en la infección, entre los 2-7 dpi, explicando las múltiples rondas de infección que ocurren en las branquias. En contraste con la expresión del gen vp15, que se expresa claramente a los 16 hpi, precediendo a los otros vps, y sugiriendo un papel temprano de la VP15, en la replicación viral y en el proceso de ensamble como una proteína asociada al DNA. De hecho, vp15 es el único gen de proteínas estructurales con una secuencia consenso TATA, donde reside el encendido más temprano de la transcripción de vp15, regulado por esta caja TATA, tal como ocurre en genes similares del virus WSSV en los cuales se ha demostrado que se expresan muy tempranamente en la infección como es el rr1, rr2, pk y dnapol. El mismo autor, en un análisis 5'RACE, indica que la transcripción de los genes vp28, vp26, vp24, vp19 y vp15 no inicia en una secuencia consenso para todos los genes, sin embargo, se conserva un motif TIS (TCA TGA C) idéntico para vp15 y vp24. Interesantemente, todos los vps contienen una secuencia rica en A/T de 25 nt río arriba de los TIS, que podría poseer una función de elemento promotor, como ha sido demostrado para los baculovirus y poxvirus donde la región sirve como un sitio de unión a una proteinasa o juegan un papel facilitando el desenrollamiento de la doble hélice del DNA, y consecuentemente, el inicio de la transcripción.

En total, la literatura describe a 5 proteínas de la envoltura viral, cuyos genes se presentan como copias simples en el genoma (Marks y cols., 2003), que han sido identificadas: VP28, VP26/P22, VP19, VP466 y VP281 (Huang y cols., 2002; van Hulten y cols., 2002), todas de importancia en los mecanismos de infección viral, sobresaliendo la VP28. De las mencionadas anteriormente, nosotros identificamos a tres (VP28, VP26 y VP15), en geles de poliacrilamida SDS-PAGE y Western Blot con anticuerpos policlonales que se generaron a partir de la inoculación de partículas virales en el modelo de ratón. En cuanto a la obtención de los marcos de

lectura abierta nosotros obtuvimos: 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 ClustalW.

Para el gene vp15 en el análisis de esta comparación mostró que existen diferencias en donde se substituyen uno o dos nucleótidos o aminoácidos, obteniendo tres distintos clusters, uno con el aislado de México que tiene una relación filogenético cercana a Taiwán con un 100% de homología, en los otros dos grupos tuvo una homología del 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 utilizando el programa Blast (EMBL), observándose que el aislado mexicano presenta una homología de 100% con los aislados de Vietnam, Korea01 EUA98/SurCarolina, Indonesia, China99/Qindao, Taiwán, Tailandia, China, China95/Dalian, Korea, con un 99% de homología se presenta la India debido a que existen diferencias en donde se substituyen 1 o 2 nucleótidos o aminoácidos formando un grupo evolutivo diferente en los cladogramas (Fig.23 a y 23b). Para la vp26 se encontraron varias secuencias similares al aislado mexicano de WSSV, la mayoría con una homología del 100%, en el análisis ClustalW se determinaron dos secuencias sin referencias de ubicación geográfica en la que reportan una sustitución en el aminoácido 336 (T→C) y en el 524 con una delección de G, en general predice tres grupos con valores bajos en el "bootstrap" indicando una confianza estadística escasamente informativa. Para el gene vp19 se observaron tres grupos diferentes con sustituciones en 2 nucleótidos o aminoácidos, 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 coinciden un 100% de homología con Taiwán y US98/South Carolina y con los demás aislados geográficos en general un 99% de homología.

Consideramos al gene vp28 por ser una de las proteína mayores con respecto a la envoltura viral, previamente identificada como una de las que infecta sistémicamente al camarón (van Hulten y cols.,2001a), por lo tanto nosotros expresamos esta proteína (pGEX5X1-VP28 transformadas en DH-5 α) utilizando un suero de ratón anti-GST y eluyendola con glutatión reducido, la cual se puede utilizar en futuros experimentos para inocular camarones y prevenir o inhibir la infección del mismo como inmunoprotección, además de tales estudios podrían ser útiles para ampliar nuestros conocimientos sobre la función del gene, lo cual podría evitar grandes pérdidas en la cosecha del camarón.

Las observaciones de van Hulten y cols. (2001a) fueron confirmadas por Zhang y cols. (2002) quienes lograron clonar al gen vp28 y analizar la localización de la proteína por inmuno-electrón microscopía. El análisis por Blast y Fasta, revelaron que el gen en estudio, estaba constituido por un ORF de 612 pb y codificaba una proteína de 204 aminoácidos, con una homología del 100 % con la descrita por el equipo de van Hulten y cols. (2000a, b; 2001a) al igual que con la proteína analizada en los purificados virales mexicanos descritos en este estudio. En estos mismos artículos señalan que, a MET; los anticuerpos marcados con oro revelaron que la posición de la VP28 fue en la envoltura nuclear, pero mencionan que es una proteína no glicosilada. El análisis reveló que el gen vp28 podría ser un gen tardío, y al buscar el motif conservado ATAAG, presente en los baculovirus de insectos no pudo ser localizado en el vp28, reforzando la enorme diferencia entre el WSSV y los Baculovirus.

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" (van Hulten y cols., 2001a)

Bajo estos aspectos, Dai y cols. (2002) preparan una estrategia que considera muy prometedora para agilizar en forma confiable el control de la infección en cultivos, con un diagnóstico rápido basado en inmunoensayos, construyendo una librería llamada "antibody phage display" con la secuencia nucleotídica completa de de la cadena pesada y ligera de la región variable del anti-WSSV scFv.

Los anticuerpos específicos producidos contra la proteína de envoltura VP28, han sido estudiados en neutralizaciones in vivo, la prueba mostró que la infección por WSSV fue neutralizada por el antisuero policlonal y que la VP28 está involucrada en este proceso (van Hulst y cols., 2001a). La VP28 es la mayor proteína de la envoltura viral, pero su localización en la estructura no es conocida. Los anticuerpos neutralizantes frecuentemente inhiben los estadios subsecuentes de la infección, lo cual es responsable de la pérdida de la infectividad. Existen solo unos cuantos ejemplos de residuos con epitopes de neutralización que están también involucrados en la adherencia del virus a sus receptores celulares, sin embargo, algunos mecanismos alternativos de inhibición pueden ocurrir durante el desnudamiento del virus o el transporte del DNA hacia el núcleo, e incluso, la unión de los anticuerpos puede inducir cambios conformacionales en las proteínas virales y pueden ser relevantes para los procesos de neutralización. La principal hipótesis de van Hulst y cols. (2001a) es que las VP28 se localiza en las proyecciones de la envoltura viral y que está involucrada en la infección sistémica, pero no excluye que otras proteínas, como la VP19, estén también involucradas en el proceso.

IX. CONCLUSION

De acuerdo a los resultados obtenidos, se concluye lo siguiente:

Las muestras de camarón cultivado con signos macroscópicos sugestivos de infección por WSSV, fueron concordantes con los resultados histopatológicos al mostrar la presencia de cuerpos de inclusión Cowdry, tipo A, eosinofilicos a basofilicos en núcleos hipertrofiados. Los tejidos afectados más comúnmente fueron epitelio branquias y tejido conectivo, concluyendo que WSSV es un virus de naturaleza sistémica que afecta aún extensivas áreas del Pacífico Mexicano donde se practica el cultivo de camarón.

Por PCR se confirmó la presencia del virus de WSSV en epizootias de camarones cultivados de *L. vannamei* en el Pacífico Mexicano, en la cual se observó que la mayoría de los primers utilizados descritos por diversos autores amplifican y detectan el genoma viral.

Con base en el tamizaje previo de las muestras, por microscopia de luz y PCC, se purificó por medio de gradientes de sucrosa al WSSV. por primera vez en México, confirmándose por MET, en tinción negativa la morfogénesis viral, comparándola con otros autores.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En tejidos fijados en gluteraldehído para MET, se observó a los virus en forma de barril, los virus inmaduros se localizaron en la región central del núcleo y los maduros en la periferia del núcleo, realizando el primer reporte de la morfología viral de un aislado mexicano de WSSV, debido a que aún no se han desarrollado a nivel internacional, sistemas de cultivos celulares para virus de camarón.

En cuanto a los análisis de proteínas de los purificados virales por geles de poliacrilamida al 10% teñidos con azul Coomassie, en el aislado mexicano se demostró la presencia de cuatro prominentes bandas proteínicas cuyos pesos

moleculares fueron de 28, 26, 19 y 15kDa. En los cuales se conoce que la 28 y la 19 pertenecen a la cápside y la 26 y 15 a la nucleocápside, confirmadas por el análisis de Western blot usando anticuerpos policlonales contra el virus implementado en ratón.

Se amplificaron los marcos de lectura abierta de cuatro genes y se clonaron en el sistema pMosBlue, importantes en cuanto al daño patológico que causa el camarón vp28, vp26, vp19 y vp15. También se obtuvieron los dominios transmembranales de las proteínas VP26 y VP19, para las proteínas VP28 y VP15 no presentaron regiones transmembranales por ser proteínas solubles.

En cuanto al análisis de comparación de secuencias nucleotídicas y de aminoácidos reportadas en el GenBank y al estudio filogenético de diferentes regiones geográficas y del aislado mexicano, éste presenta un 100% homología con el aislado de Taiwán y de US98/SouthCarolina, con las demás regiones geográficas tenían un 99% de homología o menos, como es el caso de la India que tiene de uno a dos nucleótidos o aminoácidos diferentes quedando siempre en una rama diferente.

Se implementó la metodología para la expresión de la proteína que codifica al gene de la vp28 (*E. coli* DH-5 α transformadas en el plásmido pGEX5x1-VP28) debido a que es una proteína estructural localizada en la envoltura viral, además de estar identificada como una proteína necesaria para la infección sistémica al camarón y así, utilizarla en futuros experimentos; como un eficiente inmunoprotector contra la infección viral.

X. LITERATURA CITADA

- 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.
- Altschul S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D. J. Lipman. **1997**. Gapped Blast and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Bell A. T. & D. V. Lightner. **1988**. A handbook of normal shrimp histology. Spec. Publ. No. 1, World Aquaculture Society. Baton Rouge.
- 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. *Proc Natl Acad Sci. USA* 89:9156-9160.
- Caetano A. G. & P. M. Greesshoff. **1994**. Staining Nucleic Acids. With Silver an Alternative to Radioisotopic y Fluorescent Labeling. *Promega Notes.* 45:13-18.
- Cai S., J. Huang, C. Wang, X. Song, X. Sun, J. Yu, Y. Zhang & C. Yang. **1995**. Epidemiological studies on te explosive epidemic disease of prawn in 1993-1994. *J Fish Dis.*19:112-117.
- Chen S. N. **1995**. Current states of shrimp aquaculture in Taiwan. In: Brodway, C.L. Hopkins, J.S. (Eds.), *Swimming Throug Troubled Water. Proceedings of the special Session on Shrimp Farming.* World Aquaculture Soc, pp.29-34.
- Dhar A., M.M. Roux & K.R. Klimpel, **2001**. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopietic necrosis virus and white spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR green chemistry. *J Clin Microbiol.* 39: 2835-2845.
- Davison A. **1999**. What sequence homology tells us about the functions and origins of viral genes. *Microbiology Today* 26: 160-161.

- Dawes C. J. **1988**. Introduction of Biological Electron Microscopy. Theory and Techniques. Ladd Research Industries Publisher, Burlington, Vermont pp. 311.
- Dai H., H. Gao, X. Zhao, L. Dai, X. Zhang, N. Xiao, R. Zhao & S. M. Hemmingsen. **2002**. Construction and characterization of a novel recombinant single-chain variable fragment antibody against White Spot Syndrome Virus from shrimp. *J. Immunol. Meth.* 279: 267-275.
- Durand S., D. V. Lightner, L. M. Nunan, R. M. Redman, J. Mari & J. R. Bonami. **1996**. Application of gene probes as diagnostic tool for White Spot Baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. *Dis Aquat Org.* 27: 59-66.
- Durand S., D. V. Lightner, R. M. Redman & J. R. Bonami. **1997**. Ultrastructure and morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus (WSSV). *Dis Aquat Org.* 29:205-211.
- Francki R. I., B. Fauquet, C. M. Knudson & D. L. Brown. **1991**. Classification and Nomenclature of Viruses: Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. New York: Springer-Verlag.
- Frelier P. F. **1996**. Dept. of Veterinary Pathobiology the Texas Veterinary Medical Center, Texas., A & M University, Collage Station, Texas; USA., Com. Pers.
- Galaviz S. L. **1999**. Virus del Síndrome de Taura (TSV) y virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV). Agentes causantes de epizootias en la camaricultura Mexicana. (1996-1999). Tesis de Doctorado en Ciencias. F.C.B. de U.A.N.L.
- Harlow E. & D. Lane. **1988**. Antibodies: a Laboratory Manual. (Eds). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Hosmer D. W. & S. Lemeshow. **1989**. Applied logistic regression. John Wiley & Sons. Inc., New York.
- Huang J., X. L. Song, J. Yu, & CH. Yang. **1994**. Baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis-pathology of the shrimp explosive epidermic disease. Abstracts. Yellow Sea Fishery Research Institute, Kingdom, P.R. China.

Huang F. L., M. S. Seu, CH. H. Wang & G. H. Kou. **1996**. White Spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Dis Aquat Org.* 27:215-225.

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. *J Gen Virol.* 83:2385-2392.

Inouye K., S. Miwa, N. Oseco, H. Nakano, T. Kimura, K. Momoyama & M. Hiraoka. **1994**. Mass mortalities of cultured Kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. *Fish Pathol.* 29: 149-158.

Jiménez G. F. **1999**. Acciones para prevenir enfermedades. Memorias del Foro Internacional de Camaronicultura 1996. Agosto 1-3. Mazatlán, Sinaloa; México.

Johnson P. T. **1998**. Rod-shaped nuclear viruses of crustaceans: hemocyte-infecting species. *Dis Aquat Org.* 42:91-99.

Kanchanaphum P., C. H. Wongteerasupaya, N. Sitidilokratana, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul & T. W. Flegel. **1998**. Experimental transmission of White Spot Syndrome Virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org.* 34:1-7.

Kasornchandra J., S. Boonyaratpaliny & T. Itami. **1998**. Detection of White-spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Asia: Microscopic observation and polymerases chain reaction. *Aquaculture.* 164:243-251.

Kim, C. K., P. K. Kim, S. G. Sonn, D. S. Sim, M. A. Park, M. S. Heo, T.H. Lee, J. D. Lee, H. K. Jun & K. L. Jang. **1998**. Development of a polymerase chain reaction (PCR) procedure for the detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in Penaeid shrimp. *J Fish Dis.* 21: 11-17.

Kim W. & L. G. Abele. **1990**. Molecular phylogeny of selected decapod crustaceans based on 18s rRNA nucleotide sequences. *J Crust Biol.* 10:1-13.

Krishna R. R., K. G. Rao & P. H. Babu. **1997**. White Spot Disease. A catastrophic outbreak of white spot disease virus devastates the Indian shrimp culture industry. *World Aquaculture*, 28:14-19.

Kozak M. **1989**. The scanning model for translation: an update. *J Cell Biology* 108: 229-241.

Kumar, S., K. Tamura, I. Jakobsen, & M. Nei. **2001**. MEGA 2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.

Laemmli U. D. **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lightner D. V. **1996**. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Disease of Cultures Penaeid Shrimp. World Aquaculture Soc., Baton Rouge, Louisiana, USA.

Lightner D. V., R. M. Redman, B. T. Poulos, L. M. Nunan, J. L. Mari & K. W. Hasson. **1997**. Status of the major virus diseases of concern to the shrimp farming industries of the Americas: Know distribution, host and available detection methods. Pp36-48 EN: D E Alston, B W Green y H C Clifford, editores, IV Simposio Centroamericano de Acuicultura. Cultivo Sostenible de Camarón y Tilapia. Abril 22-24, Tegucigalpa, Honduras, and the Latin American Chapter of the World Aquaculture Soc.

Lightner D. V., K. W. Hasson, B. L. White & M. Redman. **1998**. Experimental infection of Western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. *J Aquat Anim Health*. 10:271-281.

Lo C. F., G. H. Kou, C. H. Ho, S. E. Peng, C. H. Chen, H. C. Hsu, Y. L. Chiu, C. F. Chan, K. F. Liu, M. S. Su & C. H. Wang. **1996**. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis Aquat Org*. 25:133-141.

Lo C. F., C. H. Ho, Ch. H. Chen, K. F. Liu, Y. L. Chiu, P Y .Yeh, S. E .Peng, H. Ch .Hsu, H. Ch. Liu, Ch. F. Chang, M. S. Su, Ch. H. Wang & G. H. Kou. **1997**. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in

!

- captured borders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Dis Aquat Org.* 30:53-72.
- Lo Ch. F., Ch. H. Ho, S. E. Peng, Ch. H. Chen, H. Ch. Hsu, Y. L. Chiu, Ch. F. Ch. Lo, C. K. Km, S. G. Sonn, D. S. Sim, M. A. Park, M. S. Heo, T. H. Lee, J. D. Lee, H. K. Jun & K. L. Jang. **1998**. Development of a polymerase chain reaction (PCR) procedure for the detection of baculovirus associated with spot syndrome (WSBV) in Penaeid shrimp. *J Fish Dis.* 21:11
- Lo C. F., H. C. Hsu, M. F. Tsai, C. H. Ho, S. E. Peng, G. H. Kou & D. V. Lightner. **1999**. Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. *Dis Aquat Org.* 35:175-185.
- Luna L. G. **1968**. Manual of histology staining methods of the Armed Force Institute of Pathology. 3th ed. Mc Graw Hill, New York, N.Y. pp 258.
- Marks H., M. Mennens., J. M. Vlak & M. C. W. van Hulten. **2003**. Transcriptional analysis of the white spot syndrome virus major virion protein genes. *J Gen Virol.* 84:1517-1523.
- Martinez M. O. **1981**. Manual de Practicas de Histología, .F.C.B. de la U.A.N.L. Laboratorio de morfología. Monterrey, N.L. México. Pp 6-40.
- Murphy F. A., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli & M. A. Mayo. **1995**. *In*: M D Summers (eds.). *Virus Taxonomy, Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Vienna & New York. Springer-Verlag.
- Nadala C. B., L. M. Tapay & P. C. Loh. **1998**. Characterization of a non-occluded baculovirus-like agent pathogenic to penaeid shrimp. *Dis Aquat Org.* 33:221-229,1998.
- Nakano H., H. Koube, S. Umezawa, K. Momoyama, M. Hiraoaka, D. Inouye & N Oseko. **1994**. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Epizootiological survey and infection trials. *Fish Pathol.* 29:135-139.

Nunan L. M. & D. V. Lightner. **1997**. Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). *J Virol Meth.* 63: 193-201.

Nunan L. M., B. T. Poulos & D. V. Lightner. **1998**. The detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) and Yellow Head Virus in imported commodity Shrimp. *Aquaculture.* 160: 19-30.

Payment P. & M. Trudel. **1993**. *Methods and Techniques in Virology.* Marcel Dekker, Inc. Pps.309.

Park J. H. & Y. S. Lee. **1996**. Pathological study of a infectious lymphoid organ necrosis virus infection in penaeid shrimp (*Penaeus orientalis*). *Vet Res.* 36:1013-1016.

Park J. H., Y. S. Lee, S. Lee & Y. Lee. **1998**. An infectious viral disease of penaeid shrimp newly found in Korea. *Dis Aquat Org.* 34: 71-75.

Pedini M. **1999**. Can Aquaculture bridge the gap between the demand for food fish and the supply from capture fisheries. The Food and Agriculture Organization of the United Nations. IN. *World Aquaculture Soc.* 1999. April 26-may 2, 1999, Sydney Australia.

Peng S. E., C. F. Lo, C. H. Ho, C. F. Chang & G. H. Kou. **1998**. Detection of White spot baculovirus (WSBV) in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, using polymerase chain reaction. *Aquaculture* 164:253-262.

Royo F., Gironés O. & S. Ania. **1999**. Revisión sobre la Enfermedad de la Mancha Blanca (WSSV). *Revista AquaTIC*, N° 8, Noviembr. URL: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=73>

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Social, Pesca y Alimentación **2003**. *Anuario Estadístico de Pesca.* SAGARPA. México. <http://www.siea.sagarpa.gob.mx/integra/AnuarioPe2.html>.

Sambrook J. & D. Russell. **2001**. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Volume 1, Third Edition.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N. Y.

Sudha P. M., C. V. Mohan, K. M. Shankar y A. Hegde. **1998**. Relationship between White Spot Syndrome Virus infection and clinical manifestation in Indian cultured penaeid shrimp. *Aquaculture*. 167:95-101.

Supamattaya K., R. W. Hoffmann, S. Boonyaratpalin y P. Kanchanaphum. **1998**. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus pelagicus*, mud crab *Scylla serrata* and krill *Acetes sp.* *Dis Aquat Org.* 32:79-85.

Takahashi Y., T. Itami, M. Kondo, M. Maeda, R. Fijii, S. Tomonga, K. Supamattaya & S. Boonyaratpalin. **1994**. Electron Microscopy evidence of bacilliform virus infection in Kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). *Fish Pathol.* 29:121-125.

Takahashi Y., T. Itami, N. Suzuki, J. Kasornchandra, K. Supamattaya, R. Khongpradit, S. Boonyaratpalin, M. Kondo, K. Kawai, R. Kusuda, I. Hirono & T Aoki. **1996**. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of bacilliform virus (RV. PJ) DNA in *Penaeus japonicus* Bate and systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV) DNA in *Penaeus monodon* Fabricius. *J Fish Dis.* 19:399-403.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. & T. J. Gibson. **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.

van Hulten M. C. W., R. W. Golbach & J. M. Vlak. **2000a**. Three functionally diverged major structural proteins of white spot syndrome virus evolved by gene duplication. *J Gen Virol.* 81: 2525-2529.

van Hulten M. C. W, T M Feng, Ch A Schipper, L Ch Fang, K G Hsiung & J M Vlak. **2000b**. Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions. *J Gen Virol.* 81: 307-316.

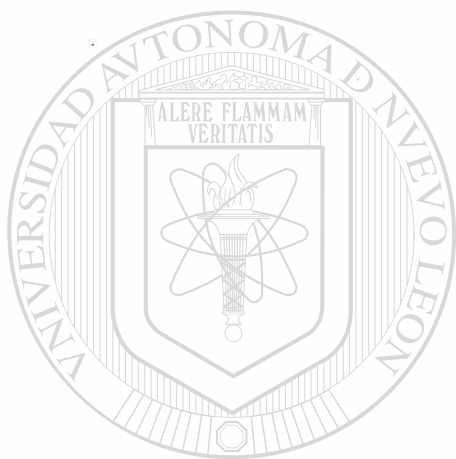
van Hulten M. C. W., M. Westenberg, S. D. Goodall & J. M. Vlak. **2000c**. Identification of Two Major Virion Protein Genes of White Spot Syndrome Virus of Shrimp. *Virology.* 266:227-236.

- van Hulst M. C. W., J. Witteveldt, M. Snippe & J. M. Vlak. **2001a**. White Spot Syndrome Virus Envelope Protein VP28 is Involved in the Systemic Infection of Shrimp. *Virology*. 285: 228-233.
- van Hulst M. C. W., J. Witteveldt, S. Peters, N. Kloosterboer, R. Tarchini, M. Fiers, H. Sandbrink, R. K. Lankhorst & J. M. Vlak. **2001b**. The White Spot Syndrome Virus DNA Genome Sequence. *Virology*. 286: 7-22.
- 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. *J Gen Virol*. 83:257-265.
- 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 XIIth International Congress of Virology, Paris.
- 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*. *Dis Aquat Org*. 23:239-242.
- Wang Y. Ch., Ch. F. Lo, P. S. Chang & G. H. Kou. **1998**. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and silt decapods in Taiwan. *Aquaculture*. 146:221-231.
- Wang Q. B; I. White, R. M. Redman & D V Lightner. **1999**. *Per os* challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarva and *Farfantepenaeus durarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. *Aquaculture*. 170:179-194.
- Wang Q., B. T Poulos & D V Lightner. **2000**. Protein analysis of geographic isolates of shrimp White spot Syndrome virus. *Arch Virol*. 145:265-274.
- Weber K.O. & M. Osborn. **1969**. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol. Chemistry*. 224:4406-44012.
- Wongteerasupaya C., J. E. Vickers, S. Sriurairatana, G. L. Nash, A. Akarajamon, V. Boonsaeng, S Panyum, A Tassanakajon, B Withyachumnarkul & T W

Flegel. **1995**. Anon- occludes systemic baculovirus that occurs in cell of ectodermal and mesodermal origin and cause high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org.* 21: 69-77.

Yang F., J. He, X. Lin, Q. Li, D. Pan, X. Zhang & X. Xu. **2001**. Complete Genome Sequence of the Shimp White Spot Bacilliform Virus. *J Virology.* 75:11811-11820.

Zhang X., H. Canhua, X. Xu & C, H, L, Hew. **2002**. Identification and localization of a prawn white spot syndrome virus gene that encodes an envelope protein. *J Gen Virol.* 83:1069-1074.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

