



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DEL VIRUS DEL SÍNDROME DE LA MANCHA BLANCA
(WSSV) EN CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO (*Litopenaeus vannamei*) DEL NOROESTE DE
MÉXICO

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

Uso Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Acuicultura)

P r e s e n t a

Delia Patricia Parrilla Taylor

La Paz, B.C.S. septiembre de 2018

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10:00horas del día_11_del Mes de septiembre del 2018, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste,

S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Caracterización genómica de virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) del noroeste de México"

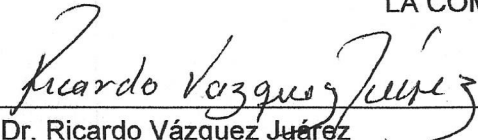
Presentada por el alumno:

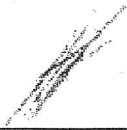
Delia Patricia Parrilla Taylor

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Acuicultura**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

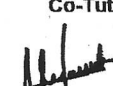
LA COMISIÓN REVISORA


Dr. Ricardo Vázquez Juárez


Dr. Norberto Vibanco Pérez

Director de Tesis

Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala

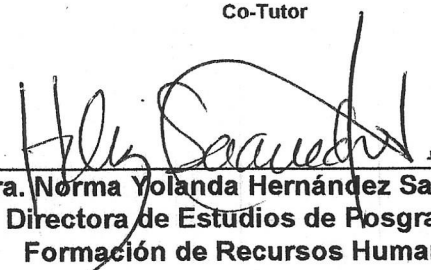
Co-Tutor

Dra. Alejandra García Gasca

Co-Tutor


Dra. Regina Elizondo González

Co-Tutor

Co-Tutor


Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

Comité tutorial

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Director de tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Dr. Norberto Vibanco Pérez

Co-Tutor

Universidad Autónoma de Nayarit

Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala

Co-Tutor

CIAD-Mazatlán

Dra. Alejandra García Gasca

Co-Tutor

CIAD-Mazatlán

Dra. Regina Elizondo González

Co-Tutor

Catedrático CONACyT- Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.

Comité revisor de tesis

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Dr. Norberto Vibanco Pérez

Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala

Dra. Alejandra García Gasca

Dra. Regina Elizondo González

Jurado de examen

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Dr. Francisco Magallón Barajas

Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala

Dra. Alejandra García Gasca

Dra. Regina Elizondo González

Suplente

Dr. Pedro Cruz Hernandez

Resumen

El virus del síndrome de la Mancha Blanca (WSSV, por sus siglas en inglés) es un virus de ADN de doble cadena de alrededor de 300 Kb, que ha sido una amenaza en la industria de camaronicultura desde su primer reporte en China en 1992 y a partir del cual se diseminó a todo el mundo. Actualmente, varios aislados han sido descritos en base a su secuencia genómica mostrando regiones con deleciones, inserciones y mutaciones por lo que varios autores sugieren que existe relación entre tamaño del genoma de WSSV y *fitness*, atribuyendo mayor ventaja de replicación a genomas más cortos. En este trabajo fue secuenciado el genoma completo de nueve cepas de WSSV (2005-2009) aisladas de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) colectados en granjas del Noroeste de México (Sinaloa y Nayarit). El tamaño de los genomas ensamblados varió de 255 a 290 Kb y los análisis comparativos revelaron que en siete cepas existen deleciones de 3 y 10 Kb en dos regiones del genoma a diferencia de dos aislados que presentaron deleciones de menor tamaño. El análisis filogenético reveló que las cepas de WSSV del norte del estado de Sinaloa se agrupan con WSSV-China (LC1, LC10, DVI) y Corea (ACF2, ACF4), mientras que cepas del estado de Nayarit son más parecidas a WSSV de Taiwán. Los resultados demuestran la variación entre aislados de WSSV y además sugiere que hubo múltiples introducciones de WSSV a la región.

De los genomas analizados, se seleccionaron cinco cepas de WSSV que presentaron diferencias tanto en la arquitectura de genoma como en su virulencia (alta virulencia, cepas JP y LG; moderada virulencia, cepas GVE05 y DIV; y baja virulencia, cepa LC10) y la patogénesis de las cepas fue evaluada a través de un cultivo primario de hemocitos, donde se evaluó *in vitro* la expresión de genes relevantes en la respuesta inmune como proteína activadora de fagocitosis (*PAP*), superóxido dismutasa dependiente de manganeso (*MnSOD*) y peroxiredoxina (*PRX*) de camarón, además de dos genes de expresión temprana-inmediata de WSSV (*IE1* y *WSSV304*) en un proceso post-infección. La expresión de *PAP* fue significativamente más alta a 1 y 3 hpi y las cepas JP y LC10 indujeron la mayor expresión. La respuesta de *MnSOD* fue elevada a 1 hpi y la expresión de *PRX* mostró un incremento significativo a las 3 hpi, probablemente debido a la ocurrencia del estallido oxidativo; los niveles de expresión de *MnSOD* y *PRX* fueron significativamente más altos a 1 y 3 hpi, respectivamente, inducidas por LG (alta virulencia) sugiriendo una respuesta aguda. En general, la expresión de la mayoría de los genes relacionados a respuesta inmune analizados decreció después de las horas iniciales de la infección. Los niveles de expresión de *IE1* y *WSSV304* fueron especialmente altos a 1 hpi en la mayoría de las cepas, confirmando el eficiente mecanismo de replicación de WSSV independiente del tamaño del genoma. Los resultados no mostraron una relación entre tamaño del genoma y virulencia de las cepas ya que la respuesta inmune temprana expresada fue heterogénea. Las deleciones presentes no afectan la replicación viral ni la capacidad infectiva, aunque pueden estar otorgando ventajas selectivas. Finalmente, regiones específicas del genoma pueden presentar deleciones sustanciales sin comprometer su viabilidad.

Palabras clave: Virus del síndrome de la mancha blanca, captura de ADN, camarón blanco, secuenciación de genomas, expresión genética, WSSV

Vo. Bo. Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Director de tesis

Summary

White spot syndrome virus (WSSV) contains a double-stranded DNA genome of about ~300 Kb which has been a serious threat in the shrimp culture since the first report in China in 1992 from which the virus spread rapidly worldwide. Based on the genomic sequence, several strains have been described showing deletions, insertions and mutation areas so several authors suggest a link between WSSV genome size and fitness, attributing high rates of replication to small genomes. In this study, complete genome sequences were determined for nine historic WSSV strains (2005-2012) isolated from the Pacific White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) captured in farm ponds in northwest Mexico (Sinaloa and Nayarit). Complete genome sequences were assembled (length range 255-290 Kb) and comparative genome analysis with WSSV strains revealed substantial deletions (3 and 10 Kb in two regions) in seven strains, with two strains differing from the rest. Phylogenetic analysis identified that the WSSV strains from the northern area of the state of Sinaloa clustered with strains from China (LC1, LC10, DVI) and Korea (ACF2, ACF4), while those from the southern region of the state of Nayarit (AC1 and JP) were clustered with strains from Taiwan. Our data offer insights into the diversity between WSSV strains and also suggest that it entered Mexico via multiple routes.

From these results, five WSSV strains differing in genome architecture as well as in virulence (high virulence JP and LG strains; moderate virulence GVE05 and DIV strains; and low virulence LC10 strain) were selected and the pathogenesis was evaluated *in vitro* using a primary haemocyte cell culture, the expressions of immune-related genes such as the phagocytosis activating protein PAP, manganese superoxide dismutase MnSOD and peroxiredoxin PRX from shrimp and two WSSV of immediate-early expression genes (IE1 and WSSV304) in a post-infection process were analyzed. PAP expression was significantly higher at 1 and 3 hpi, and JP and LC10 strains induced the highest expression. Response of MnSOD was high at 1 hpi, and a significant increase of the expression of PRX was detected at 3 hpi due to the occurrence of oxidative burst; expression levels of MnSOD and PRX were significantly higher at 1 hpi and 3 hpi, respectively, induced by the LG strain (high virulence) suggesting an acute response. In general, the expression of most immune-related genes decreased after the initial hours of infection. Expression levels of IE1 and WSSV304 were especially high at 1 hpi in almost all the analyzed strains confirming the efficient mechanism of replication of the five WSSV strains despite the genome size. The results in this study did not show an accurate link between WSSV genome size and WSSV strains with different virulence because all strains induced an early immune response in heterogeneous ways. Genomic deletions did not affect viral replication or infective capacity, although they may provide selective advantage. Finally, specific genome regions can accommodate substantial deletions without compromising viability.

Keywords: White spot syndrome virus, White shrimp, DNA capture, genome sequencing, genetic expression, WSSV

Vo. Bo. Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Director de tesis

Dedicatoria

A mis padres que me han dado todo, por su apoyo y paciencia.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca No 267040.

A la Universidad Autónoma de Nayarit, la institución que me brindo las facilidades para realizar los experimentos virales, al Dr. Norberto Vibanco Pérez y la Dra. María de Jesús Durán Avelar por todo el apoyo, recursos, asesoría y consejos brindados. A la Químico Zulia Nieves por la ayuda prestada para realizar los ensayos de infección.

Al Laboratorio de Genómica Microbiana del CIAD Mazatlán y al Dr. Bruno Gómez Gil por los recursos y apoyo otorgados.

A mis co-tutoras Dra. Alejandra García y Dra. Regina Elizondo por las recomendaciones y asesoría que contribuyeron a mejorar el actual trabajo.

Al Dr. Alejandro López y al Biol. Hever Latisnere por las facilidades otorgadas para el uso del laboratorio de Geomicrobiología y Biotecnología a su cargo. Igualmente, al Técnico Arturo Sierra por la disposición para el uso del equipo de microscopio invertido.

Al Dr. Nefthali Gutierrez Rivera por la asesoría en la preparación y análisis de los últimos ensayos de qPCR con los que cerramos el trabajo de tesis.

Al Dr. Ricardo Vázquez por los conocimientos compartidos y principalmente por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis.

A CIBNOR por ser la institución que me permitió formar mis estudios de posgrado y de manera especial al personal del área de posgrado por el apoyo y soporte brindados.

Contenido

Resumen	i
Summary	iii
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Evolución del genoma de wssv	4
2.2 Genotificación de WSSV en América	8
2.3 Variaciones genotípicas y adaptación	9
2.4 Evaluación de la infección por WSSV <i>in vitro</i>	12
2.5 Aislamiento y secuenciación de genoma viral	14
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. HIPÓTESIS	15
5. OBJETIVO GENERAL	16
5.1 Objetivos particulares	16
6. MATERIAL Y MÉTODOS	17
6.1 Material biológico	17
6.2 Preparación de inóculo de wssv y reactivación viral	18
6.3 Preparación y extracción de ADN	20
6.4 Captura de ADN viral	20
6.4.1. Amplificación por PCR de fragmentos cortos	21
6.4.2. Amplificación por pcr de fragmentos largos	22
6.4.3. Purificación de ADN	22
6.5 Construcción de librerías de ADN	23
6.5.1 Cuantificación de ADN	23
6.5.2. Fragmentación de ADN	24
6.5.3 Reparación de extremos (end-repair)	24
6.5.4 Ligación de adaptadores	25
6.5.5 Selección de tamaño de las librerías	26
6.5.6 Amplificación y purificación de la librería	27
6.6 Enriquecimiento de esferas y cargado de chip 314	27
6.7 Análisis bioinformático	28
6.7.1. Pre-procesamiento	28
Los archivos de resultados de secuenciación fueron descargados en el servidor de CIAD- Mazatlán (R815 Dell 64-core) para ser analizados vía remota a través de SSH. Los archivos de lecturas originales en formato .bam se convirtieron a formato .fastq mediante el programa bam2fastx de Samtools	28
6.7.2 Análisis de alineamientos	30
Los archivos .sam que se obtuvieron de Bowtie2 fueron transformados mediante línea de comandos:	30
6.7.3 Anotación	30
6.8 Análisis filogenético	31

6.9 Comparación de genomas	32
6.10 cultivo <i>in vitro</i>	32
6.10.1 Preparación de extractos virales	32
6.10.2 Medio de cultivo de hemocitos (MCH)	33
6.10.3 Desarrollo del cultivo primario de hemocitos	34
6.10.4 Titulación del extracto viral	34
6.10.5 Cultivo primario de hemocitos y reto con WSSV	36
6.10.6 Extracción de ARN total a partir de células en monocapa	37
6.10.7 Preparación de cDNA	38
6.10.8. Análisis de pcr cuantitativo en tiempo real	38
6.11 análisis estadístico	40
7. RESULTADOS	41
7.1 Amplificación de fragmentos largos para captura de ADN	41
7.2 Librerías genéticas de ADN	42
7.3 Reporte de secuenciación	43
7.4 Alineamiento de lecturas al genoma de referencia	44
7.5 Alineamiento global de genomas preliminares contra genoma de referencia	47
7.6 Anotación de genomas draft con genome transfer utility (GATU)	48
7.7 Análisis filogenético	55
7.8 Sintenia de genomas	56
7.9 Comparación circular con mapa de brig	57
7.10 Cultivo <i>in vitro</i> como modelo de expresión de WSSV	59
7.11 Expresión genética	59
7.11.1 Expresión de genes relacionados al sistema inmune	60
7.11.2 Expresión de genes tempranos de wssv	62
8. DISCUSIÓN	65
9. CONCLUSIONES	75
10. LITERATURA CITADA	76
11. ANEXOS	83

Lista de figuras

Figura 1. Modelo de propagación de WSSV en el Sureste de Asia.....	6
Figura 2. Mapa del sureste asiático mostrando el posible origen geográfico y transmisión de WSSV.....	7
Figura 3. Curva de sobrevivencia para aislados de WSSV con diferente tamaño en genoma.....	11
Figura 4. Localización de las juntas locales de sanidad acuícola de donde fueron aisladas las cepas virales seleccionadas.	18
Figura 5. Diseño de los 31 pares de oligos para amplificación del genoma viral tomando como referencia el genoma de WSSV-CN.....	21
Figura 6. Amplificaciones de 20 kb correspondientes a las cepas GVE05 y DVI.	41
Figura 7. Gel de agarosa mostrando los productos de librerías fragmentadas correspondientes a cepas de WSSV seleccionadas por tamaño (~330 pb).	42
Figura 8. Gel virtual generado por Experion de BioRad mostrando los productos de las librerías fragmentadas de WSSV seleccionadas por tamaño (~330 pb).	42
Figura 9. Gráficas de cobertura de las lecturas (reads) de las nueve cepas alineadas al genoma de referencia con Bowtie2.	45
Figura 10. Representación semi-circular de 10 genomas de WSSV mexicanos mostrando regiones genómicas con variabilidad.....	46
Figura 11. Mapa linear del genoma de WSSV-China y el genoma DVI.	50
Figura 12. Mapa linear del genoma de WSSV-China y el genoma AC1.	51
Figura 13. Mapa linear del genoma de WSSV-China y el genoma JP.....	51
Figura 14. Mapa linear del genoma de WSSV-China y el genoma ACF2.....	52
Figura 15. Mapa linear del genoma de WSSV-China y el genoma LG.	52
Figura 16. Mapa linear del genoma de WSSV-China y el genoma ACF4.....	53
Figura 17. Mapa linear del genoma de WSSV-China y el genoma LC10.	53
Figura 18. Mapa linear del genoma de WSSV-China y el genoma LC1.	54
Figura 19. Mapa linear del genoma de WSSV-China y el genoma GVE05.	54
Figura 20. Árbol filogenético con 14 genomas completos de WSSV.	55
Figura 21. Comparación de genomas completos entre WSSV-MX08 y aislados de Sinaloa y Nayarit utilizando el algoritmo de Mauve progresivo.....	56
Figura 22. Visualización global con BRIG de genomas de WSSV aislados del Noroeste de México.....	58
Figura 23. Expresión relativa de PAP en un cultivo in vitro de hemocitos de <i>L. vannamei</i> infectado con las cepas de WSSV JP, LC10, LG, GVE y DVI.	61
Figura 24. Expresión relativa de MnSOD en un cultivo in vitro de hemocitos de <i>L. vannamei</i> infectado con las cepas de WSSV JP, LC10, LG, GVE y DVI..	61
Figura 25. Expresión relativa de PRX en un cultivo in vitro de hemocitos de <i>L. vannamei</i> infectado con las cepas de WSSV JP, LC10, LG, GVE y DVI..	62
Figura 26. Expresión relativa de IE1 en un cultivo in vitro de hemocitos de <i>L. vannamei</i> infectado con las cepas de WSSV JP, LC10, LG, GVE y DVI..	63
Figura 27. Expresión relativa de WSS304 en un cultivo in vitro de hemocitos de <i>L. vannamei</i> infectado con las cepas de WSSV JP, LC10, LG, GVE y DVI.....	64

Lista de tablas

Tabla I. Información general de los aislados asiáticos considerados ancestrales de WSSV y sus genomas.....	7
Tabla II. Titulación de cinco cepas de WSSV en hemocitos de camarón utilizando el método de Reed y Muench (1938).....	36
Tabla III. Secuencias nucleotídicas de oligonucleotidos para cuantificación por PCR tiempo real.	39
Tabla IV. Datos obtenidos de la secuenciación de seis cepas de WSSV.	43
Tabla V. Datos obtenidos de la secuenciación de seis cepas de WSSV en la segunda corrida de secuenciación.....	43
Tabla VI. Datos obtenidos de las 9 librerías después de pasar por el proceso de limpieza y filtrado de lecturas.	44
Tabla VII. Resultados del alineamiento con el programa Bowtie2	44
Tabla VIII. Número de contigs y tamaño del genoma preliminar obtenido del mapeo al genoma de referencia.	47
Tabla IX. Resumen de estadísticas del ensamble con AMOScmp usando WSSV-CN como referencia y números de acceso Genbank para las cepas anotadas con GATU	50
Tabla X. Descripción de las cepas de WSSV aisladas de <i>L. vannamei</i> utilizadas para el reto in vitro	59

1. INTRODUCCIÓN

Estimaciones recientes sugieren la presencia de 10^8 virus/mL en aguas costeras, la mayoría de estos virus son patógenos de organismos planctónicos y tienen un estrecho rango de especies hospederas potenciales en el medio ambiente. Los virus tienen importancia como agentes de mortalidad microbiana, reguladores de ciclo de carbono y de nutrientes en los océanos, aunque algunos son claramente responsables de enfermedades en muchos de los organismos superiores (Suttle, 2005; Wilhelm y Suttle, 1999). La acuicultura intensiva y el movimiento internacional de organismos para cultivo ha alterado el equilibrio natural exponiendo a los organismos a nuevos ambientes y a sus virus a nuevas especies hospederas (Reno, 1998).

Las enfermedades virales se han convertido en una seria amenaza para la producción acuícola en el mundo. En la acuicultura de camarones peneidos, siete de las nueve enfermedades enlistadas por la World Animal Organization (OIE) corresponden a enfermedades virales, de éstas, cinco son nativas de América o se han convertido en enzoóticas después de su introducción afectando de manera continuada en la región. Las pandemias causadas por el virus del síndrome del taura (TSV Taura syndrome virus), virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV, *White Spot Syndrome Virus*) y los menos extendidos, virus de la cabeza amarilla (TYH, Yellow head virus), enfermedad de la necrosis hematopoyética (IHHNV, Infectious hematopoyetic hypodermic necrosis virus) y el virus de la mionecrosis infecciosa (IMNV, Infectious myonecrosis virus) han costado a la industria billones de dólares (Lightner, 2011). De entre los virus mencionados, el virus del síndrome de la mancha blanca es el principal agente infeccioso que amenazan el cultivo de camarón, se convirtió en un factor que limita el crecimiento sostenido de la industria, es uno de los virus más extendidos y prevalentes en el cultivo de camarones peneidos e históricamente el de mayor impacto en la industria. Su conformación genética ha permitido que esté presente en un amplio rango de hospederos, que incluye más de 90 especies de artrópodos, además de varias especies de acarreadores pertenecientes a diferentes phyla

que funcionan como reservorios marinos naturales y son hospederos asintomáticos constituyendo potenciales fuentes de infección (Sánchez-Paz, 2010). La infección puede causar la mortandad en un stock de cultivo de camarón desde las 48 horas del inicio de la enfermedad, y llega a causar el 100% de mortalidad en un periodo de 3-5 días (Chou *et al.*, 1995; Marks *et al.*, 2005; Sablok *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 1995; Wongteerasupaya *et al.*, 1995).

WSSV fue descubierto por primera vez en Taiwán en 1992 (Chou *et al.*, 1995), de donde se dispersó rápidamente hacia la mayoría de las zonas de cultivo en el sureste de Asia. WSSV pareció inicialmente limitarse al continente asiático hasta que fue reportado en EUA en 1995. En 1999, también fue reportado en México y Sudamérica (Rosenberry, 2000), posteriormente se detectó en Francia e Irán.

WSSV es el único miembro de la familia monotípica *Nimaviridae* y pertenece al género *Whispovirus*. El virión de WSSV tiene forma baciliforme, presenta una larga estructura flagelar en un extremo cuya función no ha sido descrita, su largo es de 210 a 420 nm y de 70–167 nm en diámetro. El genoma de WSSV es de aproximadamente 290-300 kb, tiene forma circular con ADN de doble cadena codificando 184 marcos de lectura abiertos (ORF), está ensamblado por al menos 58 proteínas estructurales y su envoltura viral consta de 35 diferentes proteínas (Li *et al.*, 2007; Marks *et al.*, 2004; Sánchez-Paz, 2010).

Debido a la alta prevalencia del virus WSSV en el Noroeste de México y las implicaciones globales de éste en el área de acuicultura, es necesario entender la dinámica de su genoma, lo cual puede facilitar su evolución creando nuevas variantes que se pueden adaptar a un ambiente cambiante y al genotipo del hospedero. A través del estudio detallado y análisis de la estructura completa del genoma se podrán hacer comparaciones entre el genoma de aislados obtenidos de dos estados del Noroeste de México altamente productivos y los genomas ya publicados. Posteriormente, se podrán caracterizar variaciones no descritas en proteínas estructurales, ya que son las primeras moléculas en interactuar con el hospedero y están relacionadas con la patogenicidad en

Litopenaeus vannamei. Dado que sólo existe un genoma completo de referencia del WSSV que infecta en la región Noroeste de México y éste fue obtenido del estado de Sonora (WSSV-MX08), se generará a través de tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS) el genoma de varios aislados obtenidos de Sinaloa y Nayarit para realizar comparaciones genómicas globales con aislados locales y de otras regiones geográficas.

2. ANTECEDENTES

Son pocos los marcos de lectura abiertos (open reading frame ORF) de WSSV que presentan identidad con proteínas caracterizadas. Sólo el 21-29% muestran similitud significativa en las bases de datos públicas y únicamente 12 de los ORFs (6%) han logrado ser asignados a una función putativa representando genes que codifican para la replicación del ADN, metabolismo de nucleótidos y modificación de proteínas (Chakraborty y Ghosh 2014; Van Hulst *et al.*, 2001).

Actualmente, se ha caracterizado el genoma completo de varios aislados de WSSV en su mayoría pertenecientes al continente asiático y más recientemente dos aislados de América y un aislado de Australia. Cada uno de estos genomas secuenciados tiene su propio sistema de nomenclatura de genes u ORFs, por lo que el grupo de estudios de Whispovirus del ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) eligieron el aislado de China WSSV-CN como el aislado tipo (Leu *et al.*, 2009).

Los alineamientos de los genomas asiáticos indican que presentan diferencias en cuanto a longitud dadas por deleciones y sustituciones nucleotídicas. Para el continente americano, se publicó el genoma de un aislado de Sonora y aún no existen reportes sobre su arquitectura ni alineamientos comparativos con los genomas asiáticos ancestrales ya publicados. Lo anterior es relevante ya que el análisis de secuencias podría indicar el ancestro de WSSV del Noroeste de México y el grado en que la virulencia está indicada por diferencias en la estructura del genoma de la región.

2.1 Evolución del genoma de WSSV

Intentos iniciales por genotipificar WSSV basados en patrones de polimorfismo en fragmentos de restricción y análisis composicional de dinucleótidos sugieren que, excepto por pequeñas diferencias genéticas, los aislados geográficos que se han analizado son similares y están cercanamente relacionados. La publicación de secuencias de genomas

completos de WSSV aislados de Taiwán, China, Tailandia y Corea (WSSV-KR) (Chai *et al.*, 2013; Tsai *et al.*, 2000; Van Hulten *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001), demuestra las variaciones en tamaño del genoma entre los aislados geográficos (Tabla I). Al tomar como referencia la secuencia del genoma de WSSV aislado de China, éste presenta dos fragmentos que no existen en el genoma de WSSV de Tailandia, los fragmentos C42 (510 pb) y el fragmento LN4 (2833 pb), lo que evidencia la heterogeneidad genética que ocurre entre aislados de distintos orígenes y sugiere la existencia de variantes de WSSV con diferente complejidad genética.

El alineamiento de las secuencias publicadas ha demostrado que, aunque los aislados comparten una identidad de 99%, existen diferencias dentro del genoma que pueden ser categorizadas en cuatro regiones genómicas variables divididas en: (i) una región genómica susceptible a largas deleciones (13 Kb), referida como región variable ORF 23/24; (ii) una región variable susceptible a recombinación (ORF 14/15); (iii) una región genómica codificante para una transposasa; (iv) repeticiones variables en número de tándem (VNTRs) dentro de las regiones codificantes de ORF 75, ORF 94 y ORF 125; y mutaciones de nucleótidos sencillos, incluyendo deleciones, inserciones o polimorfismos de nucleótidos (SNPs) a lo largo de todo el genoma, los cuales han sido sugeridos como marcadores genéticos para el estudio de la diversidad de WSSV (Marks *et al.*, 2004; Shekar *et al.*, 2012).

Entre los *loci* variables, las variaciones asociadas con ORF 23/24 y ORF 14/15, susceptibles a deleciones y eventos de recombinación, han sido sugeridas como útiles en identificar relaciones evolutivas entre los aislados de WSSV, mientras que los VNTRs asociados dentro de loci microsatelitales se han indicado para estudios epidemiológicos (Marks *et al.*, 2004; Pradeep *et al.*, 2008; Shekar *et al.*, 2012). Con la finalidad de identificar el origen de algunos aislados de WSSV de Vietnam se han utilizado las diferentes asociaciones con ORF 14/15 y ORF 23/24, con base en ellos se ha sugerido que el aislado de Vietnam (WSSV-VN) y el de Tailandia (WSSV-TH) tienen un ancestro común, el cual representa un linaje independiente de WSSV-CN y WSSV-TW, todos evolucionando de un

ancestro común, y que WSSV entró a Vietnam a partir de múltiples introducciones (Fig. 1) (Dieu *et al.*, 2004).

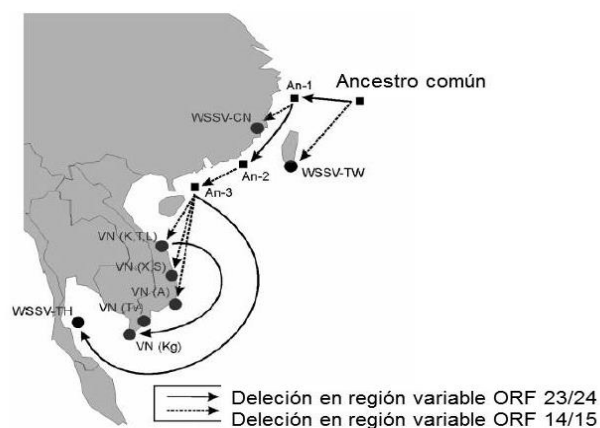


Figura 1. Modelo de propagación de WSSV en el Sureste de Asia. Los círculos representan aislados identificados y los cuadrados aislados hipotéticos. Cada línea representa una delección. Ancestro = AN y aislados de WSSV-Vietnam =VN. (Adaptado de Dieu *et al.*, 2004).

Marks *et al.* (2005) mencionan que WSSV- TH-96-II, un aislado colectado en Tailandia en 1996 (~312 Kb) tiene un fragmento adicional de 5316 pb en la región variable ORF 14/15 comparando con WSSV-TH por lo que proponen que éste puede ser el ancestro putativo de todas las variedades modernas ya que mantiene todas las secuencias de WSSV descritas a la fecha además de que su análisis sugiere que de este ancestro pudiera haberse originado a WSSV-TW y WSSV-CN. Aún no son claros los mecanismos y circunstancias por los que han ocurrido delecciones en el genoma de WSSV, Pradeep *et al.* (2008) caracterizaron aislados de India enfocándose en el análisis de las regiones ORF 14/15 y ORF 23/24 y sugieren un modelo de propagación más amplio dadas las delecciones encontradas, donde la cepa ancestral de WSSV originó WSSV-96-II y posteriormente se trasladó a Taiwán y al resto del sureste asiático (Fig. 2).

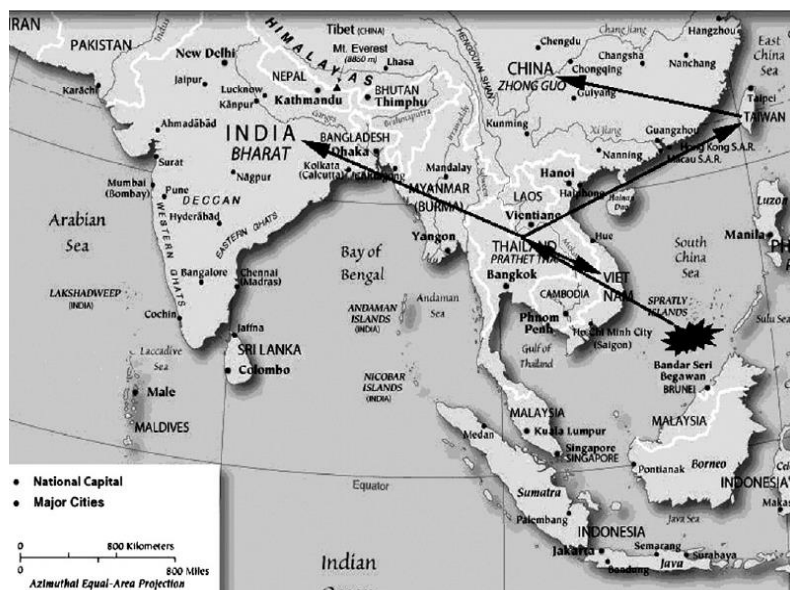


Figura 2. Mapa del sureste asiático mostrando el posible origen geográfico y transmisión de WSSV (Pradeep *et al.*, 2008).

El estudio de Chai *et al.* (2013) muestra un análisis comparativo entre cuatro genomas de WSSV asiáticos reportados, encontrando que existe alta similitud y áreas con diferencias en secuencias entre los aislados, siendo la mayoría inserciones pequeñas y una gran delección de alrededor de 12 Kb.

Tabla I. Información general de los aislados asiáticos considerados ancestrales de WSSV y sus genomas.

Aislados	WSSV-TW	WSSV-CN	WSSV-TH	WSSV-KR
Hospedero	<i>Penaeus monodon</i>	<i>Penaeus japonicus</i>	<i>Penaeus monodon</i>	<i>Litopeneus vannamei</i>
Tamaño de genoma (pb)	307,287	305,107	292,967	295,884
Acceso GenBank	AF440570	AF332093	AF369029	JX515788
Fecha de aislamiento	Noviembre-1994	Octubre-1996	Mayo-1996	Agosto-2011
Localidad de aislamiento	Sureste de Taiwan	Xiamen, China	Suratthan, Tailandia	Jeollanam-Do, Corea

2.2 Genotificación de WSSV en América

WSSV se reportó por primera vez en EUA en 1995 (Nunan *et al.*, 1998) y más tarde en el resto del continente (México, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panamá, Ecuador y Colombia) (López-Félix, 2002; Muller *et al.*, 2010), causando eventos de mortalidad y un impacto económico en América desde hace más de 20 años. Existen estudios sobre la evolución de cuatro regiones variables del genoma de WSSV en el noroeste de México (Ramos-Paredes *et al.*, 2012) e identificación de variaciones en regiones particulares (VNTRs en ORF 94, 75 y 125) de aislados de Brasil (Muller *et al.*, 2010) y noroeste de México (Duran-Avelar *et al.*, 2015).

En un intento por evaluar regiones variables del genoma de WSSV en el noroeste de México, Ramos-Paredes *et al.* (2012), demostraron que la región hipervariable ORF 14/15 de WSSV aislado de *Litopenaeus vannamei* en el noroeste de México ha experimentado eventos de recombinación y es genéticamente similar al aislado de India, encontraron evidencia de recombinaciones genéticas que incluyen translocaciones de un segmento de ORF 108, inversiones, inserciones y deleciones en segmentos de ORF 78-80 en muestras de 43 camarones tomados de eventos epizooticos entre 2000 y 2005 sugiriendo que las mutaciones asociadas con esta región pueden ser una estrategia de adaptación para infectar otras especies hospederas. Recientemente se publicó un estudio sobre genotificación de aislados de WSSV de Sonora, Sinaloa y Nayarit, mediante el análisis de haplotipos de ORF 75, 94 y 125 determinando que existe una gran diversidad de haplotipos de región a región y año con año, indicando una alta tasa de mutación en el genoma de WSSV y la introducción de aislados virales a la zona (Duran-Avelar *et al.*, 2015).

Recientemente se publicó el genoma completo de un aislado proveniente del estado de Sonora, México, (WSSV-MX08, accesion no: KU216744), el cual fue ordenado y alineado usando como referencia el genoma de Tailandia (Rodríguez-Anaya *et al.*, 2016). Se observó la ausencia de ORFs 122 y 123 los cuales de igual manera, están ausentes en el genoma de Corea, además variación genética en ORFs 14 y 15 y una deleción de 575 pb sugiriendo la necesidad de estudios relacionados a la caracterización de las variaciones

genómicas así como la asociación de variables como la distribución geográfica y fenotipos de virulencia entre otros.

2.3 Variaciones genotípicas y adaptación

Se considera que existen menos variaciones genéticas en virus de ADN, comparado con virus de ARN, aunque su frecuencia y su importancia biológica son poco conocidas. En los virus de ARN, la gran diversidad de variantes está asociada con mecanismos de transferencia horizontal de genes que propician evolución viral, progresión de enfermedad y fracaso de tratamientos antivirales (Depledge *et al.*, 2011; Vignuzi *et al.*, 2006).

Los virus de ADN presentan mayor estabilidad genética y el cambio en su genoma es más lento que en los virus de ARN (Domingo *et al.*, 1999). Aun así, se han observado cambios que dan lugar a la formación de nuevas variantes por eventos de microevolución a lo largo del tiempo en algunos virus de ADN estudiados, por ejemplo: virus de hepatitis B, virus de la peste porcina africana (ASFV), herpesvirus de ostreidos y herpesvirus de humanos Hsv-1 entre otros (Bai *et al.*, 2015; Batista *et al.*, 2015; Stuyver *et al.*, 2000; De Villiers *et al.*, 2010).

En organismos cultivados, se han observado rangos de evolución incrementados comparados con aquellos en sistemas naturales. En rhabdovirus aislado de trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss*, se encontró un elevado grado de sustitución en nucleótidos, hasta 2.5 veces más rápido que en las poblaciones naturales (Einer-Jensen *et al.*, 2004). Esto es debido a que, en sistemas de cultivo intensivo, los altos rangos de evolución resultan del aumento en la presión selectiva de factores asociados con las técnicas modernas de acuicultura incluyendo el uso de especies hospederas nuevas, continua adición de organismos susceptibles, hacinamiento y modificación de la temperatura, además de organismos inmunizados (Winton, 1992). Así mismo, la elevada tasa de evolución de genomas virales en sistemas acuícolas puede ser resultado del incremento en el número de replicaciones del virus por año, como lo reporta Troyer y Kurath (2003) para virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHHNV) en Norteamérica, donde el rango de

evolución en una zona geográfica con acuicultura intensiva, resultó ser de 3 a 4 veces más elevada dada la alta diversidad de nucleótidos encontrada y un rango de mutación de 1.2×10^{-3} , en comparación con Alaska y la costa de Washington.

En relación al estudio de la tasa de evolución de WSSV, Waikhom *et al.* (2006), realizaron estudios sobre los efectos patológicos de pasajes de aislados virales entre diferentes especies de crustáceos, encontrando que pasajes entre diferentes hospederos altera la patogenicidad e induce variación genómica en el número de unidades repetitivas en tándem (VNTRs) de ORF 94. Tratando de establecer la estabilidad del genoma de WSSV Sindhupriya *et al.* (2014), analizaron el patrón de repeticiones en ORF 94 de dos aislados con diferencias en esta región, y después de realizar seis pasajes secuenciales no se encontraron diferencias. Es por estos resultados que resulta interesante realizar estudios de microevolución con genomas completos y determinar de manera más amplia los cambios que ocurren, particularmente en el genoma de WSSV.

Pocos estudios basados en variaciones genotípicas se han llevado a cabo para encontrar la trayectoria de la estructura genética de las poblaciones de WSSV con el fin de inferir el patrón de virulencia seguido por este virus. Algunos estudios proveen soporte para establecer una relación entre virulencia y aptitud (*fitness*) de WSSV dependiente del tamaño del genoma. Pradeep *et al.* (2009) realizaron un estudio donde se infectó un grupo de camarones *Penaeus monodon* con una mezcla de tres aislados con diferencias genéticas caracterizadas por el tamaño de ORF94. En los organismos que murieron, se encontró que el aislado con el menor tamaño en su genoma fue el que finalmente prevaleció y causó mortalidad por enfermedad (ORF 94, 3 UR). Ello sugiere que, aunque los aislados fueron igualmente virulentos en un experimento anterior, al mezclarlos, el aislado con el menor tamaño fue el más apto o adecuado (aislado B, ORF 94, 3 UR, 294 459 pb). Por otro lado, Marks *et al.* (2005), mezclaron dos aislados con diferente tamaño en la región ORF14/15 y encontraron que el virus con el menor tamaño (293 Kb; WSSV-TH) prevaleció en los camarones infectados sobre el de mayor tamaño (312 Kb; WSSV-TH-96-II) después de cuatro pasajes de reinfección.

Tratando de estudiar la relación entre tamaño de genoma y *fitness*, Zwart *et al.* (2010) evaluaron la sobrevivencia (al final del experimento) y tiempo de sobrevivencia media para cinco aislados de WSSV con diferente tamaño de genoma TH-96-II (312 kpb), VN-T, VN-X, VN-S (los 3 de 298 kpb), y TH-96-I (293 kpb). Encontraron que la proporción de sobrevivencia se incrementa significativamente con el tamaño del genoma (Fig. 3), lo que apoya la hipótesis de que la adaptación en un ambiente de acuicultura se ve incrementada conforme decrece el tamaño del genoma.

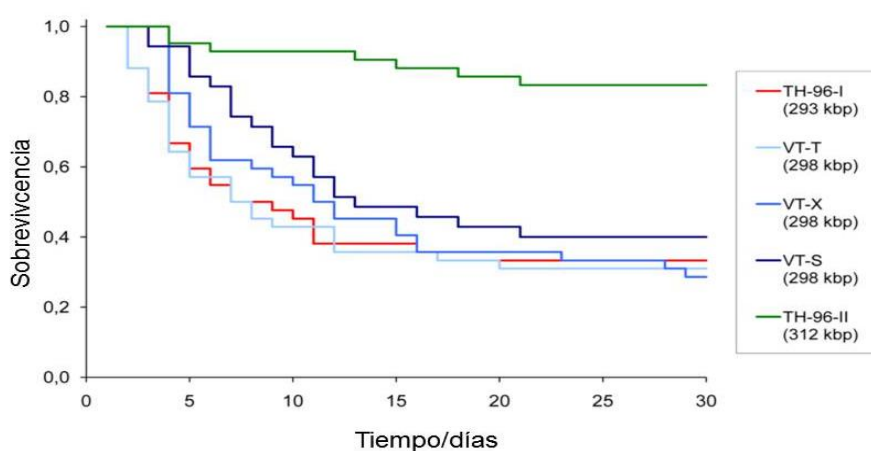


Figura 3. Curva de sobrevivencia para aislados de WSSV con diferente tamaño en genoma (Adaptado de Zwart *et al.*, 2010)

Las bases moleculares de la diferencia en virulencia aún no son claras, aunque se ha observado que puede tener un papel importante la variante de WSSV de genoma 19 Kb más corto debido a que presentó ventajas en replicación, exhibiendo como consecuencia mayor adaptación competitiva que aquellas variantes con genomas más grandes, probablemente incrementando la adaptación observada por la cual el virus llega a establecerse fácilmente en los sistemas de cultivo de camarón (Marks *et al.*, 2005; Pradeep *et al.*, 2009; Tan y Shi, 2011).

Sin embargo, la respuesta de una enfermedad infecciosa no solo está determinada por el patógeno, sino también por la respuesta inmune del hospedero. Investigaciones en

mamíferos demuestran que cepas virales de diferente virulencia logran inducir diferente respuesta en el hospedero y dar lugar a diferente respuesta a la enfermedad (Gao *et al.*, 2014; López *et al.*, 2003).

2.4 Evaluación de la infección por WSSV *in vitro*

Los estudios mencionados anteriormente se han realizado con base en bioensayos con organismos vivos, evaluando la virulencia de las cepas identificadas mediante ensayos de mortalidad donde la respuesta es dependiente del estado individual del hospedero.

Los cultivos celulares tienen gran potencial en el estudio y comprensión de la virulencia y potencial aparición de patógenos emergentes ya que nos permite un mejor entendimiento de sus bases moleculares en periodos de tiempo relativamente cortos. El desarrollo y disponibilidad de cultivos celulares han expandido la investigación en virología haciéndola técnicamente más factible (Ma *et al.*, 2015). Los cultivos celulares de invertebrados marinos han sido estudiados y desarrollados desde la década de los 60's, sin embargo, a la fecha no se han logrado definir líneas celulares a pesar de que se ha experimentado en una variedad de especies, tejidos y medios de cultivo.

A pesar de ello, se han logrado mantener cultivos primarios para investigar procesos específicos y como herramientas alternas a la experimentación con organismos completos con aplicaciones biotecnológicas y patológicas (Rinkevich, 1999; Sud *et al.*, 2001).

La inmunidad en crustáceos es definida como una respuesta de defensa interna no-específica que incluye componentes humorales y celulares, los cuales cooperan para eliminar a los microorganismos. Las células sanguíneas de los crustáceos (hemocitos), tienen un importante papel en las reacciones de defensa en contra de microorganismos patógenos, parásitos y otras partículas externas que puedan entrar al hemocele (Bachere *et al.*, 2004; Jose *et al.*, 2010). El cultivo primario de hemocitos de crustáceos se ha desarrollado como un modelo de infección para estudios de la propagación *in vitro* de una variedad de patógenos. Los hemocitos circulantes son cruciales para proteger a los

organismos invertebrados contra microorganismos invasores ya que participan en el reconocimiento, fagocitosis, melanización y citotoxicidad además de la liberación de moléculas de defensa humoral que permiten la inmovilización y destrucción de patógenos invasores (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006; Jose *et al.*, 2010).

Los hemocitos son el tipo celular más apropiado para estudios de respuesta hospedero-patógeno y han sido explorados en investigaciones sobre el efecto de enfermedades y tóxicos en decápodos tales como el cangrejo de río, *Procambarus clarkii* (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2005; Zheng y Lu, 2009), *Pacifastacus leniusculus* (Watthanasurorot *et al.*, 2010) y *Penaeus monodon* (Jose *et al.*, 2010). El uso de un cultivo primario celular puede, además, proveer una herramienta para el mejor entendimiento de los mecanismos moleculares de la infección. Jose *et al.* (2010) desarrollaron un método para el cultivo primario de hemocitos de *P. monodon*, comprobando su viabilidad hasta por 8 días y la susceptibilidad de las células a WSSV, confirmando que el cultivo celular desarrollado es adecuado. Los modelos *in vitro* de cultivos de hemocitos pueden ser utilizados como una herramienta para cuantificar toxicidad y genotoxicidad de drogas, patógenos, manejo de químicos y contaminantes en sistemas de acuicultura. La ausencia de una línea celular inmortal de crustáceos y la falta de sistemas estandarizados para su cultivo celular continúan siendo limitantes.

El virus de síndrome de la mancha blanca codifica para genes que se pueden clasificar en tres grupos: expresión inmediata-temprana (IE), temprana y tardía (Marks *et al.*, 2005). Los genes IE, son la primera clase de genes virales que se expresan durante la infección y codifican en su mayoría proteínas reguladoras para el cambio de latencia a ciclo lítico, proteínas esenciales para la iniciación de la infección primaria y de estructura para el ensamble de viriones, siendo cruciales para la patogénesis de WSSV (Everett, 2000; Lin *et al.*, 2013).

2.5 Aislamiento y secuenciación de genoma viral

La secuenciación de genomas completos es la aproximación más útil para identificar la gama de variaciones genéticas en poblaciones virales dadas por la presión selectiva y posteriormente es posible realizar su anotación funcional. El proceso de captura por medio de amplificación de fragmentos por PCR o hibridación de ácidos nucleicos virales para purificar y enriquecer el ADN viral donde el genoma del hospedero ocurre en exceso, han permitido la secuenciación profunda y alineamientos más precisos de genomas virales completos utilizando tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS) (Depledge *et al.*, 2011). Actualmente, las nuevas tecnologías de secuenciación (Next-Generation Sequencing NGS) dan lugar a la generación de millones de lecturas cortas, que permiten la secuenciación de genomas completos de forma económica y con alta cobertura después de una serie de pasos bioinformáticos (filtrado de lecturas y ensamblaje) (Barzon *et al.*, 2011). Más aún, con el uso de librerías de códigos de barras, es posible obtener tantas secuencias de genomas como muestras se hayan procesado, siendo además una aproximación con un gran valor potencial para el descubrimiento de nuevas especies de virus en acuicultura (Ng *et al.*, 2013).

El obstáculo principal para la obtención de un genoma viral es la poca cantidad relativa de material genético presente, por lo que los métodos moleculares se basan en una amplificación selectiva (Allander *et al.*, 2001). Originalmente, la secuenciación de un genoma viral requería del aislamiento de las partículas virales para la posterior generación de genotecas por clonación de fragmentos y su secuenciación capilar (Sanger). Estas técnicas de clonación y secuenciación capilar resultan limitadas para seleccionar y purificar el ADN viral que muchas veces se presenta en una baja concentración comparada con el ADN total de la muestra, por lo que la secuenciación directa de ácidos nucleicos virales mezclado con el ADN del hospedero diluye las proporciones de las secuencias propias del genoma viral. Los métodos actuales para secuenciación se han beneficiado significativamente con el enriquecimiento de ADN específico de patógenos intracelulares

previo a la secuenciación, permitiendo que la cantidad de ADN de interés se incremente en una librería para ser secuenciada (Depledge *et al.*, 2011).

3. JUSTIFICACIÓN

WSSV es el agente etiológico de origen viral más importante que afecta al camarón blanco, cuyo cultivo es dominante en el continente Americano. A pesar de la importancia económica de la infección por WSSV en el noroeste de México, la información sobre posibles diferencias entre aislados está basada en el análisis de VNTRs y es insuficiente para realizar asociaciones precisas sobre el ancestro asiático del WSSV presente en México así como la dimensión de la variabilidad genómica en el área.

El aislamiento y la información generada del análisis de genomas completos en este trabajo contribuirán a identificar zonas de variabilidad así como sitios conservados que pudieran ser relacionados a patogenicidad.

4. HIPÓTESIS

Los genomas aislados de WSSV en México presentarán variaciones nucleotídicas que lo distinguirán filogeográficamente del resto de genomas identificados en Asia. A nivel regional, las variaciones genéticas observadas entre aislados podrán asociarse a diferencias en la virulencia de los mismos.

5. OBJETIVO GENERAL

Obtener los genomas completos de WSSV de aislados virales de Sinaloa y Nayarit y comparar la variación entre los genomas de WSSV reportados. Posteriormente caracterizar las variaciones asociadas a virulencia en un modelo *in-vitro* para la expresión de genes de WSSV y genes específicos de las células hospederas.

5.1 Objetivos particulares

1.- Obtener la secuencia completa del genoma de WSSV de aislados virales de Sinaloa y Nayarit.

2.- Identificar variaciones particulares y regiones altamente conservadas entre genomas de WSSV aislados de México y los genomas de WSSV asiáticos a partir de análisis comparativos globales.

3.- Comparar la virulencia de las variantes de WSSV encontradas a través de un reto viral en un cultivo primario de hemocitos de *L. vannamei* como un modelo *in-vitro* en donde se evaluará la respuesta del hospedero y del virus.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

Se seleccionaron ocho cepas de WSSV a partir de una base de datos de muestras de WSSV genotipificadas por medio de secuenciación de los marcadores ORF 94, 75 y 125 las cuales presentaban diferencias en el porcentaje de mortalidad registrado en campo y patrón de SNPs (Anexo A). Las cepas seleccionadas fueron referenciadas respecto al tejido infectado proveniente de una colección de organismos positivos a WSSV y almacenados a -80 °C (Laboratorio de Investigación en Biología Molecular e Inmunología, de la Universidad Autónoma de Nayarit, UAN) obtenidos de colectas en eventos de mortalidad en granjas del noroeste de México como parte de las campañas sanitarias de los comités de sanidad acuícola de los estados de Sinaloa y Nayarit (de 2011 al 2012). Además de estas muestras, se obtuvo una muestra proveniente de Guasave, Sinaloa colectada en 2005 (donada por el Dr. P. Álvarez, CIIDIR).

De las nueve muestras seleccionadas, seis provenían del estado de Sinaloa, tres aislados virales pertenecen a la región de Guasave, uno aislado en 2005 (GVE05) y dos en 2012 (ACF2, ACF4), dos aislados de la región de Angostura en 2012 (LC1, LC10) y uno de la región de El Dorado en 2012 (DVI). Del estado de Nayarit, fueron seleccionados tres aislados, uno del norte del estado, en la zona de Tecuala (AC1), de la zona centro en la región denominada Tuxpan Rosamorada (JP) los cuales fueron colectados en 2011 y el último del sur de Nayarit el cual fue obtenido en 2012 de la región de San Blas (LG) (Fig. 4).



Figura 4. Localización de las juntas locales de sanidad acuícola de donde fueron aisladas las cepas virales seleccionadas.

Se extrajo ADN de pleópodos de las muestras seleccionadas utilizando QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen, Hilden, Alemania), para confirmar la infección con WSSV por medio de reacción de PCR anidado con oligos específicos diseñados por Kimura *et al.* (1996).

6.2 Preparación de inóculo de WSSV y reactivación viral

De cada una de las nueve muestras se preparó un inóculo para reactivación del virus utilizando la metodología propuesta por Escobedo-Bonilla *et al.* (2005), en la cual se homogenizaron 2 g de tejido en 10 volúmenes de buffer de fosfatos salino (PBS 2X) pH 7.4 y posteriormente fueron centrifugados a 3000 x *g* (20 min a 4 °C). Cada sobrenadante fue recuperado y clarificado por una nueva centrifugación a 13000 x *g* (20 min a 4 °C), pasado a través de un filtro de membrana de 0.45 µm (Millipore) y almacenado en alícuotas de 1 mL a -80 °C.

Cada inóculo fue reactivado en grupos de seis organismos juveniles de *L. vannamei* de 5-7 gr de peso obtenidos de una granja a 30 km de Villa Unión, en el estado de Sinaloa, previamente diagnosticados como libres de WSSV (Kimura *et al.*, 1996) y aclimatados en el laboratorio de bioensayos de la UAN.

La reactivación se realizó en acuarios de 10 litros, inyectando 50 μ L de una dosis infectiva definida como alta (dilución 1:3) en la parte lateral del tercer segmento abdominal, manteniendo condiciones controladas de temperatura promotoras de replicación en laboratorio (27 – 28 °C) y aireación constante. Además de los nueve grupos con inyección de inóculo, se mantuvo un acuario control negativo en donde seis organismos fueron inyectados con el diluyente (PBS 2X). Después de un período de 48 horas post-inoculación (hpi), los organismos infectados presentaron signos de enfermedad como aletargamiento y coloración rojiza. Al encontrarse en estado moribundo, fueron colectados, etiquetados y mantenidos a -20 °C. El bioensayo fue finalizado a los 6 días en donde el 80 % de los organismos ya habían sido colectados presentando los signos de infección. En el momento de la colecta, un pleópodo fue retirado a cada organismo para el análisis de cuantificación de copias virales utilizando el kit IQ REAL WSSV quantitative system (GeneReach Biotechnology Corp) para confirmar y estimar el grado de infección siguiendo el protocolo correspondiente.

Los organismos que presentaron mayor concentración viral fueron utilizados para la purificación del virus de acuerdo a la metodología de Xie *et al.* (2005), se disectaron 2 g de tejido infectado que fueron homogenizados en 50 mL de buffer TNE (50mM Tris-HCl, 400mM NaCl, 5mM EDTA, pH 8.5) conteniendo una combinación de inhibidores de proteasas (1mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 1mM benzamidina y 1mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), se centrifugaron a 3500 x g por 5 min a 4 °C, se filtraron con una malla de nylon, y el sobrenadante fue centrifugado a 30,000 x g por 30 min a 4 °C en tubos de 8 ml (Quick-Seal, Beckman). La parte superior fue retirada cuidadosamente y el pellet se resuspendió en 1 mL de buffer TM (50mM Tris-HCl, 10mM MgCl_2 , pH 7.5). Después de centrifugar a 3,500 x g por 5 min, las partículas virales se sedimentaron por centrifugación a 30,000 x g

por 20 min, se resuspendieron, y mantuvieron en 1 mL de buffer TM conteniendo 0.1 % NaN_3 .

6.3 Preparación y extracción de ADN

El ADN genómico de WSSV fue extraído a partir de partículas virales intactas, a través de un tratamiento con DNAsa-I (2 U/uL) para eliminar selectivamente el ADN genómico de camarón, (Allander *et al.*, 2001). La DNAsa-I fue inactivada con EDTA incubando a 70°C por 10 min, adicionalmente se utilizó proteinasa K (600 mAU/mL de solución) para digerir la DNAsa residual y la capsida viral de WSSV liberando el contenido genómico de los viriones. El ADN viral liberado fue recuperado por adsorción en columnas de sílica con el Kit DNeasy Blood & tissue (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.4 Captura de ADN viral

El ADN genómico de WSSV fue amplificado utilizando oligos que se sobrelapan utilizando como referencia el genoma de WSSV aislado de China (WSSV-CN; GenBank accesión no. AF332093) dado que el comité del ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) encargado de estudio del grupo *Whispovirus* lo designó como el aislado tipo (Leu *et al.*, 2009). El genoma completo de China tiene un tamaño de 305,107 pb por lo que fue cortado hipotéticamente en 31 secciones contiguas, 30 de 10,000 pb y una más de 5,107 pb (Fig. 5) utilizando el lenguaje de programación Perl.

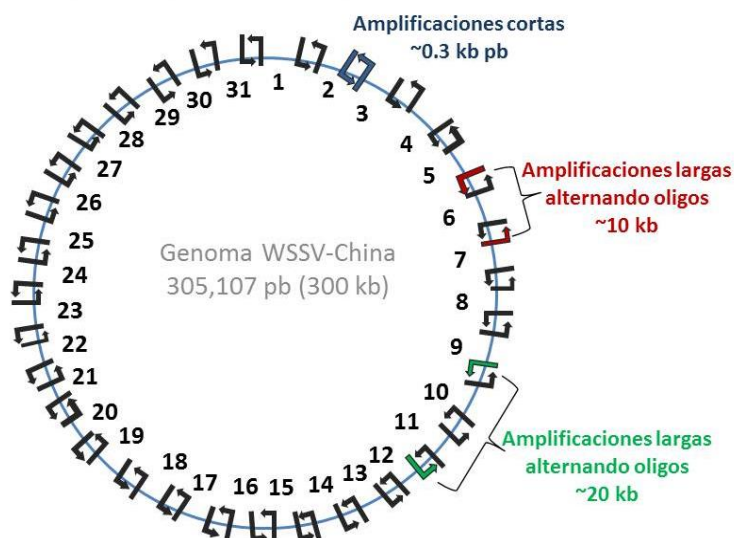


Figura 5. Diseño de los 31 pares de oligos para amplificación del genoma viral tomando como referencia el genoma de WSSV-CN, en azul los oligos que amplifican reacciones cortas y en verde y rojo las combinaciones para lograr amplificaciones de 10 y 20 Kb.

A partir de los 31 fragmentos de 10,000 pb se diseñaron oligos específicos en las primeras 1000 bases de cada fragmento generado *in silico*, empleando el programa Primer3 (Fig. 5), las secuencias fueron alineadas en el programa Blast contra los genomas reportados para corroborar que no existiera unión con más de una secuencia en muestras de ADN de WSSV. Los oligos fueron sintetizados por la compañía Macrogen (Anexo B).

6.4.1. Amplificación por PCR de fragmentos cortos

Los oligos fueron diluidos a una concentración de $100 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$ y se prepararon $400 \text{ } \mu\text{L}$ de cada uno a una concentración de $10 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$ para preparar las reacciones de amplificación por PCR. Se llevó a cabo la amplificación de todos los fragmentos pequeños para verificar que el diseño fue correcto, se amplificaron 31 fragmentos con el ADN de cada cepa de WSSV y todas las reacciones se realizaron en un volumen de $20 \text{ } \mu\text{L}$ utilizando las mismas condiciones de amplificación para todos los fragmentos. La información de las

secuencias, así como su tamaño esperado dada su posición en el genoma, se indican en los Anexos B y C.

Las condiciones de reacción del PCR fueron: 1 X de buffer PCR, 4.0 mM de $MgCl_2$, 0.8 μM de los oligos correspondientes, 0.4 mM de dNTPs, 1 U de taq Polimerasa, 0.5 μL de ADN y H_2O para un volumen final de 20 μL . Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C/5 min \rightarrow 30X (98 °C/30 s \rightarrow 58 °C/ 40 s \rightarrow 70 °C/1 min) 72 °/10 min \rightarrow 4 °C/ ∞

6.4.2. Amplificación por pcr de fragmentos largos

Después de verificar por PCR las amplificaciones cortas, se realizó la amplificación de fragmentos largos mediante combinación de los oligos sentido y antisentido contiguos según como se indica en la figura 5, siguiendo el protocolo de PrimeSTAR GXL polymerase (TaKaRa Bio, Shiga, Japón) la cual es una polimerasa de alta fidelidad que permite la amplificación de productos de 30 Kb o más, según las especificaciones del fabricante. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 20 μL conteniendo 1X de 5X PrimeSTAR GXL Buffer, 4.0 mM de dNTP Mixture, 0.2 - 0.3 μM de cada oligo específico, 100 ng de ADN y 1 U de PrimeSTAR GXL DNA Polymerase. La amplificación se realizó en un termociclador de punto final (C1000, BioRad) con las siguientes condiciones de amplificación: 95 °C/30 s \rightarrow 30X (98 °C/10 s \rightarrow 60 °C/ 15 s \rightarrow 70 °C/10 min) 72 °/10 min \rightarrow 4 °C/ ∞ . Los productos se visualizaron en gel de agarosa al 1 % con TAE 1X, usando el fluorocromo GelRedTM. Con este protocolo, se obtuvieron amplicones de PCR de cadena larga de aproximadamente 20 Kb para capturar el genoma completo de cada cepa de WSSV evitando el ADN genómico del hospedero.

6.4.3. Purificación de ADN

Los amplicones fueron mezclados formando pools por cada cepa, ecualizando las amplificaciones en un sólo tubo y purificados de residuos de amplificación (remanentes de oligo, dNTPs, sales) con el kit de extracción QIAEX[®] II Gel Extraction Kit (Qiagen), el cual

permite la purificación de productos de PCR mediante adsorción de moléculas de ADN de 40 pb- 50 Kb a partículas de sílica en la presencia de sales. Se tomaron cantidades arbitrarias (3-10 μL) de cada una de las reacciones de PCR basado en la intensidad relativa de los amplicones mostradas en gel de agarosa, se agregaron 3 volúmenes de buffer QX1 y 2 volúmenes de H_2O mezclando con pipeta y manteniendo la coloración amarilla lo que indica que el pH es <7.5 y que permite la correcta adsorción del ADN a las partículas de sílica. Se agregaron 10 μL de QIAEX II y se mezcló por inversión. La reacción fue centrifugada por 30 s y se removió el sobrenadante, posteriormente el pellet se lavó 2 veces con 500 μL de buffer PE y se dejó secar al aire 15 min hasta que el pellet se tornó blanco. Para eluir el ADN y resuspender el pellet, se agregaron 20 μL de buffer Tris-Cl 10 mM, pH 8.5 y se incubó a 50°C por 10 min. Posteriormente, el tubo se centrifugó por 30 s y el ADN purificado se transfirió a tubos nuevos, finalmente fue visualizado en gel de electroforesis.

6.5 Construcción de librerías de ADN

Se prepararon nueve librerías genéticas con los amplicones de las cepas de WSSV para secuenciar en el Ion Personal Genome Machine (PGM) system siguiendo el procedimiento descrito por los kits de Thermo Scientific diseñados para Ion Torrent.

6.5.1 Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN purificado se llevó a cabo con el sistema Qubit 2.0 (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA), el cual se basa en la cuantificación fluorométrica de blancos específicos a 260 nm. Para la cuantificación, se mezcló 1 μL de los amplicones purificados previamente diluidos 1:10 en buffer TE con 199 μL de solución de trabajo (1 μL

de Qubit Reagent + 199 μL de Qubit buffer) en tubos para fluorescencia incubando por 2 min y posteriormente el lector detectó la fluorescencia.

La concentración de ADN se estimó con el empleo de una curva estándar de concentración conocida la cual permitió obtener una alícuota de 100 μg de concentración de las cepas de WSSV llevando a un volumen de 50 μL .

6.5.2. Fragmentación de ADN

Se utilizó el método de fragmentación por sonicación utilizando el sistema bioruptor UCD-200 para fragmentar los transcritos de ADN de ~ 20 Kb en segmentos de 200-300 pb con 3 ciclos de 15 min (45 min en total) en frío. Terminado el proceso, los fragmentos se observaron en gel de electroforesis para confirmar el tamaño de 50-500 pb, con una media alrededor de los 200 pb.

6.5.3 Reparación de extremos (end-repair)

Se agregó agua libre de nucleasas hasta llevar el volumen del ADN fragmentado del pool de amplicones de 50 μL a 79 μL en cada uno de los tubos agregando la siguiente reacción: 20 μL de buffer 5x End Repair, 1 μL de enzima end repair para obtener 100 μL de volumen total utilizando el sistema de Ion Plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific, USA).

La reacción se incubó por 20 min a temperatura ambiente y transcurrido el tiempo de incubación, el ADN se purificó con el kit Agencourt AMPure (Beckman Coulter, Pasadena, CA) como se describe a continuación:

- a) Se agregó 180 μL de Agencourt AMPure reagent beads (1.8 por volumen de muestra) a la muestra, mezclando con la pipeta hasta homogenizar la solución con el ADN, se precipitó e incubó por 5 min.
- b) A los tubos se les dió un pulso en centrifuga y se colocaron en un soporte magnético por 3 min hasta que la solución se aclaró. Se removió y descartó el sobrenadante sin mover el pellet.
- c) Se agregó 500 μL de etanol al 70 % y se incubó por 30 s, volteando el tubo 2 veces en el magneto para mover las perlas, después de que la solución se aclaró, se removió y descartó el sobrenadante.
- d) Se repitió el paso anterior para un segundo lavado.
- e) Se removió el sobrenadante remanente con una pipeta y manteniendo los tubos en el magneto, se dejaron secar al aire por ≤ 5 min.
- f) Los tubos se removieron del magneto, se agregó 25 μL de TE a las muestras mezclando con pipeta 5 veces y vortex por 10s para mezclar completamente.
- g) Se les dió un pulso de centrifugación a los tubos y se colocaron nuevamente en el rack magnético por 1 min hasta que la solución se aclaró. El sobrenadante con el DNA eluido el cual fue transferido a un tubo nuevo de 1.5 mL eppendorf LoBind.

6.5.4 Ligación de adaptadores

Para producir la librería con código de barras se realizó una ligación con el kit Ion Xpress P1, adaptadores barcode y reparación de cortes (Thermo Fisher Scientific, USA). En un tubo de 0.2 mL, se combinaron los siguientes reactivos para librerías con código de barra: ~ 25 μL de gADN fragmentado, 10 μL de buffer ligasa 10 X, 2 μL de adaptador Ion P1, 2 μL de Ion Xpress Barcode X^{++} (X^{++} = código de barra seleccionado), 2 μL de mix dNTP, 49 μL de agua libre de nucleasas, 2 μL de ligasa ADN y 8 μL de polimerasa nick repair para obtener un volumen final de 100 μL , finalmente se mezclaron con pipeta cuidadosamente.

Los tubos se colocaron en un termociclador (C1000 BioRad) con el siguiente programa: 25 °C/15 min → 72 °C/5 min → 4 °C/∞

La reacción se transfirió a un tubo de 1.5 mL y se continuo directamente con la siguiente etapa de purificación de ADN. Se agregaron 140 µL de Agencourt AMPure XP Reagent (1.4 x volumen de muestra) a la muestra, se pipeteó 5 veces para mezclar la solución, posteriormente un pulso de centrifugación e incubación de la mezcla por 5 min a temperatura ambiente. Se continuó con el proceso de purificación de ADN descrito anteriormente.

6.5.5 Selección de tamaño de las librerías

La selección de la librería se llevó a cabo en E-Gel SizeSelect al 2 % (Invitrogen, USA), de acuerdo a este método el tamaño de los fragmentos debe ser de ~ 330 pb para una librería con lecturas de 200 bases utilizando la siguiente metodología:

1. Se preparó la unidad E-Gel iBase y E-Gel Transiluminador Safe Imager, el gel se cargó de acuerdo a lo siguiente:
 - a. 20 µL del ADN ligado se cargó en los pozos de la parte superior
 - b. 10 µL del marcador molecular en el pozo del centro (50 pb 1 µg/ µL diluido en buffer TE 1:40 para obtener 25 µg/ µL)
 - c. Los pozos vacíos se llenaron con 25 µL de agua libre de nucleasas
2. Se corrió el E-Gel SizeSelect 2% por 15 min.
 - a. La electroforesis se detuvo cuando la banda de 350 pb llegó a la línea de referencia, se rellenó los pozos de colecta con 10 µL de agua libre de nucleasas
 - b. Se monitoreo el marcador de referencia y la corrida se detuvo cuando el fragmento de 350 pb del marcador entró completamente en el pozo de colecta.

- c. Se colectó la solución del pozo de colecta utilizando una pipeta sin tocar el fondo, se rellenó con 10 μL de agua libre de nucleasas y se recolectó la solución. El total recuperado fue de $\sim 30 \mu\text{L}$ para cada pozo con librería.

6.5.6 Amplificación y purificación de la librería

Se combinaron y mezclaron los siguientes reactivos repartiendo los 130 μL totales en 2 tubos de 0.2 mL (65 μL): 100 μL de Platinum PCR Super Mix High Fidelity (Invitrogen), 5 μL de Library Amplification Primer Mix (Thermo Fisher Scientific), 25 μL de la librería genómica seleccionada por tamaño. Los tubos se colocaron en un termociclador (C1000 BioRad) con el siguiente programa: 95 $^{\circ}\text{C}/5 \text{ min} \rightarrow 15\text{X} (95 \text{ }^{\circ}\text{C}/15 \text{ s} \rightarrow 58 \text{ }^{\circ}\text{C}/15 \text{ s} \rightarrow 70 \text{ }^{\circ}\text{C}/1 \text{ min}) 4 \text{ }^{\circ}\text{C}/\infty$

Después de la amplificación, las librerías de ADN fueron transferidas a tubos LoBind de 1.5 mL para continuar con su purificación. Se agregaron 195 μL de Agencourt AMPure XP Reagent (1.5 volúmenes por muestra), se mezcló completamente y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Se continuó con el procedimiento ya descrito para purificación, se tomó una alícuota para observar los fragmentos y posteriormente las librerías se almacenaron a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.6 Enriquecimiento de esferas y cargado de chip 314

Se preparó el equipo Ion One Touch y los reactivos del Ion PGM Template OT2 solutions 200 kit v2 (Applied Biosystems, USA) de acuerdo al manual. Las librerías previamente cuantificadas se llevaron a 100 pM en un volumen de 25 μL de acuerdo a las indicaciones para Ion Ampliseq DNA Library. En tubos eppendorf LoBind de 2 mL se mezcló la siguiente reacción: 25 μL de agua libre de nucleasas, 500 μL de Ion PGM Template OT2 200 Reagent mix, 300 μL de Ion PGM Template OT2 200 PCR Reagent B, 50 μL de Ion PGM

Template OT2 200 Enzyme mix y 25 μL de la librería genómica diluida para llevar a un volumen final de 900 μL .

100 μL de las partículas Ion Sphere (ISPs) del kit previamente mezcladas se agregaron a la reacción, se mezcló a máxima velocidad por 5s y se procedió a llenar el filtro de reacción ensamblado Ion PGM One Touch Plus Reaction Filter con la solución. Con pipeta se agregó los 1000 μL de solución de amplificación en el puerto de muestra seguido de 1 ml de aceite de reacción y se invirtió para mezclar. El filtro de reacción se insertó en el instrumento Ion One Touch seleccionando el protocolo para PGM: Ion PGM Template OT2 200 kit. Terminada la reacción, el pellet de ISPs fue recuperado y se continuó con el proceso de enriquecimiento en el One Touch ES, al terminar, el tubo de PCR contenía >200 μL de esferas enriquecidas (ISPs). Este procedimiento se llevó a cabo de igual manera para cada una de las librerías preparadas y se procedió a lavar y cargar el chip Ion 314 kit v2 (Applied Biosystems, USA) para su secuenciación en el Ion Torrent PGM.

6.7 Análisis bioinformático

6.7.1. Pre-procesamiento

Los archivos de resultados de secuenciación fueron descargados en el servidor de CIAD-Mazatlán (R815 Dell 64-core) para ser analizados vía remota a través de SSH. Los archivos de lecturas originales en formato .bam se convirtieron a formato .fastq mediante el programa bam2fastx de Samtools.

Los archivos .fastq fueron analizados con el programa FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) para determinar la cantidad, tamaño y calidad de las lecturas en cada librería. Posteriormente, para el procesamiento de las lecturas, estas fueron previamente procesadas para eliminar lecturas

de baja calidad (phred score $Q < 20$) y remoción de las secuencias de los adaptadores utilizando los software Cutadapt (Martin, 2011) y Prinseq (Schmieder y Edwards, 2011).

Los archivos obtenidos de cada librería fueron alineados a un genoma de referencia a través del programa Bowtie 2 v2. 0.2 (Langmead y Salzberg, 2012). Se realizaron los alineamientos de cada aislado al genoma de China (WSSV-CN; accession no. AF332093) para el cual se creó un archivo FM Index a partir del genoma de referencia (basado en la transformación de Burrows-Wheeler) con el comando bowtie2-build:

```
$bowtie2-build [genoma de referencia WSSV-China] [nombre de los archivos de salida]
```

Los archivos previamente procesados fueron alineados utilizando los archivos índices anteriormente creados:

```
$bowtie2 -p 8 -x ~/indexes/CH [archivo de secuencias.fastq] > [nombre del archivo.sam]
```

El software Anvi'o v2.3.1 (Eren *et al.*, 2015) fue empleado para generar un mapeo de las lecturas generadas de cada genoma al genoma de referencia (WSSV-CN) evidenciando las zonas de cambios en cada uno de los genomas secuenciados. En este caso, se incluyó en el mapa los datos de WSSV-MX08 a manera de comparación preliminar.

Para verificar la cobertura de las lecturas obtenidas del alineamiento con Bowtie2 se realizaron gráficas con el programa R. Primero se utilizaron comandos de samtools para obtener un archivo .bam a partir del cual se ordenaron las lecturas alineadas y se utilizó el comando genomeCoverageBed para obtener la cobertura de cada base. Finalmente, empleando herramientas gráficas del lenguaje R en las tablas de coordenadas de mapeo sobre el genoma de referencia, se obtuvieron las gráficas de cobertura correspondientes a cada genoma.

6.7.2 Análisis de alineamientos

Los archivos .sam que se obtuvieron de Bowtie2 fueron transformados mediante línea de comandos:

```
$cat [archivo.sam] | grep -v ^@ | awk '{print "@ "$1"\n"$10"\n+\n"$11}' > nombre del archivo.fastq
```

```
$awk 'NR % 4==1 {print ">"$0} NR % 4==2 {print $0}' [archivo.fastq] > nombre del archivo.fasta
```

Los archivos generados fueron analizados con las herramientas que ofrece el software Viramp a través de la interfase en internet Galaxy. Los archivos alineados fueron ensamblados a través de AMOScmp (basado en MUMer) (Pop *et al.*, 2004) a partir del genoma de referencia (WSSV-CN) el cual realizó un ensamble comparativo orientando la información y dando lugar a un archivo preliminar de contigs (Genomas draft).

Con el archivo de genoma preliminar ordenado se realizó el alineamiento global para verificar los sitios de inserción, delección y cambios en los genomas comparando con el genoma de referencia. El alineamiento global se realizó en la plataforma en línea de EMBOSS con el programa Stretcher que permite alinear globalmente archivos de secuencias ([http:// ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_stretcher/nucleotide](http://ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_stretcher/nucleotide)).

6.7.3 Anotación

Se realizó la anotación de los archivos de genomas preliminares mediante el software Genome annotation transfer utility (GATU) (Tcherepanov *et al.*, 2006) el cual anota el genoma basado en un genoma de referencia. Las proteínas del genoma de referencia son comparadas contra el genoma que será anotado para identificar y nombrar los genes/péptidos en ese genoma. La aplicación GATU se conectó al servidor remoto el cual utilizó TBLASTN para comparar la secuencia traducida de manera dinámicamente.

Finalmente cada genoma fue anotado con referencia al genoma de China, Tailandia y México (WSSV-CN; accession no. AF332093, anotado en 534 CDS, WSSV-TH; accession no. AF369029, anotado en 184 ORFs y WSSV-MX08; accession no. KU216744, anotado en 169 ORFs) con el fin de poder realizar comparaciones ya que al menos para WSSV-CN y WSSV-TH es sistema de nomenclatura es diferente. También se utilizó BLAST para realizar alineamientos locales y NEEDLE para los alineamientos globales de proteínas de interés para visualizar las variaciones específicas entre regiones variables y conservadas de las cepas secuenciadas.

Los datos asociados con las cepas analizadas fueron depositados como archivos de lectura de secuencia (Sequence Read Archive, SRA) en NCBI, número de acceso de Bioproject PRJNA413204 y referencias individuales (Biosamples) SAMN07757839 – SAMN07757847. Las anotaciones individuales obtenidas fueron guardadas en formato Sequin Table Format a través del software de Artemis para ser depositadas en la base de datos de Genbank.

6.8 Análisis filogenético

Se elaboró un árbol filogenético de genomas completos para determinar el probable origen y las relaciones evolutivas de las cepas secuenciadas por el método de vecino más cercano (neighbour-joining). El alineamiento global de las 14 cepas de WSSV completamente secuenciadas (cinco genomas de WSSV públicos en Genbank) se realizó con el software Clustal X (Thompson et al., 2002). El archivo obtenido fue utilizado para construir el árbol filogenético rectangular usando PhyML en Smart Model Selection (Guindon y Gascuel, 2003) con 1000 réplicas de Bootstrap y el programa FigTree (version 1.4.3) fue usado para dibujar el árbol.

6.9 Comparación de genomas

El promedio de la identidad de nucleótidos fue calculada en línea con el software (Average Nucleotide Identity, ANI) (<http://enveomics.ce.gatech.edu/ani>). Se realizaron dos tipos de gráficos para la visualización y el análisis global de los genomas secuenciados y anotados. Se utilizó el programa Mauve el cual permitió desplegar el arreglo estructural de las secuencias genómicas asignando como secuencia referencia WSSV-MX08 a partir de la cual se orientan LCBs en las secuencias de los genomas preliminares.

Finalmente se realizó una comparación múltiple con los genomas completos de 14 aislados de WSSV (cinco genomas públicos en Genbank) a través de un mapa circular de similitud genómica utilizando el programa BRIG (BLAST Ring Image Generator). El mapa generó un anillo central usando la referencia WSSV-CN lo que permitió visualizar las diferencias y similitudes entre éste y cada uno de los genomas analizados.

6.10 cultivo *in vitro*

A partir de la información de la estructura genética de las cepas de WSSV obtenida en la primera parte del trabajo, además de datos de mortalidad de campo y laboratorio, fueron seleccionadas cinco cepas que mostraron diferencias significativas en tamaño, virulencia y origen para determinar la respuesta celular ante la infección con diferentes aislados de WSSV.

6.10.1 Preparación de extractos virales

Se prepararon extractos virales con tejido branquial almacenado a -80 °C previamente confirmado como positivo a WSSV los cuales fueron obtenidos de un experimento de reactivación de cinco cepas de WSSV realizado en UAN. Se pesó 1 g de tejido branquial, se colocó en un tubo falcon con 6 µL de PBS 10X y se homogenizó en frío con un homogenizador Polytron PT2100 hasta obtener una emulsión. El homogenizado fue

centrifugado a 3000 x *g* durante 30 min a 4 °C, el sobrenadante fue filtrado con membranas de 0.45 µm y alicuotado en tubos eppendorf.

Una muestra 1:10 de cada uno de los extractos de WSSV preparado fue utilizada para cuantificar la carga viral de cada muestra por PCR tiempo real (qPCR) en el Laboratorio de Referencia, Análisis y Diagnóstico en Sanidad Acuícola de CIBNOR-Hermosillo (Mendoza-Cano y Sánchez-Paz, 2013).

6.10.2 Medio de cultivo de hemocitos (MCH)

El medio de cultivo se preparó en base a los protocolos descritos por Andrade (2011) y Dantas-Lima *et al.* (2012) en condiciones de esterilidad (dentro de una campana de flujo laminar) y a 25-27 °C.

Formulación:

- Medio 2x Leibovitz L-15 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA)
- 10.5% Sales de Chen's
- 10% Suero fetal bovino (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA)
- 1% Penicilina/ Estreptomina

Los componentes fueron agregados de acuerdo a la formulación y con el medio 2x L-15 llevado al volumen requerido. El pH se ajustó a 7.55 y se filtró con una membrana de 0.20 µm a un frasco estéril.

El medio L-15 fue preparado a concentración doble (2x L-15), disolviendo la cantidad de polvo usado originalmente para preparar 1 litro de solución en la mitad (500 ml) de volumen. El peso del polvo fue agregado en pequeñas porciones hasta que fue completamente disuelto en agua ultrapura. El pH se ajustó a 7.5 y la solución final se filtró con una membrana de 0.45 µm.

La solución de sales de Chen's (Chen y Wang, 1999) está formulada con sales inorgánicas para mantener el balance iónico en el medio. La solución fue filtrada con una membrana de 0.20 µm a un frasco estéril.

Formulación:

- Cloruro de sodio (1750 mM; 102 g/L)
- Cloruro de magnesio (120 mM; 11.8 g/ L)
- Sulfato de magnesio (90 mM; 16.7 g/ L)
- Cloruro de calcio (50 mM; 5.1 g/ L)
- Cloruro de potasio (20 mM; 1.8 g/ L)

6.10.3 Desarrollo del cultivo primario de hemocitos

Se utilizaron camarones de 11-13 g previamente confirmados como libres de enfermedades que fueron mantenidos bajo condiciones controladas de salinidad y temperatura en agua de mar filtrada y alimentados con alimento comercial.

Antes de obtener los hemocitos, los organismos fueron lavados en una solución de agua y cloro, posteriormente uno a uno fueron secados y desinfectados con alcohol al 70%. El área del cefalotorax fue nuevamente desinfectada con alcohol al 96% dentro de una campana de flujo laminar. La hemolinfa fue extraída de la zona ventral utilizando jeringas de 1 cm³ conteniendo 200 µL de anticoagulante SIC-EDTA (Solución isotónica de camarón, 10 mM HEPES, 20 mM EDTA, 10 mM KCl, 450 mM NaCl) mantenidas en frío para retardar la coagulación. Se extrajeron 200 µL de cada organismo y toda la hemolinfa colectada se mezcló en un tubo falcon de 50 mL. 10 µL de hemolinfa fue combinada con 10 µl de azul tripano y 20 µL de MCH en un tubo eppendorf para realizar el conteo de hemocitos en una cámara de Neubauer siguiendo la fórmula:

$$\text{Número de células/mL} = \text{Promedio de los 4 cuadrantes} \times 10^4 \times \text{dilución} \quad (1)$$

6.10.4 Titulación del extracto viral

Se realizó la titulación de las cepas virales de WSSV seleccionadas mediante el método matemático de Reed y Muench (1938) el cual permite calcular el título viral expresado en dosis infectiva 50 a partir de la observación del efecto citopático en placas de cultivo de 96 pozos. Una dosis infecciosa según Reed y Muench (1938) se expresa como la dosis o cantidad del inóculo suministrado que produce efecto (en este caso la muerte

por WSSV) en el 50 % de las células). Aunque la cuantificación de viriones mediante PCR en tiempo real es muy utilizada para determinar títulos virales, tiene la desventaja de que cuenta solamente las copias de un segmento del genoma viral en el inóculo, sin importar si las copias son infecciosas.

$$\text{Índice} = [(\% \text{dilución arriba del } 50\%) - 50\%] / [(\% \text{ dilución arriba del } 50\%) - (\% \text{ dilución abajo del } 50\%)] \quad (2)$$

La mezcla de hemocitos fue diluida en MCH y se prepararon tres placas de cultivo de 96 pozos y a cada pozo se agregó 200 μL de hemocitos en MCH a una concentración de 1×10^5 células por pozo. Después de sembradas las placas, fueron incubadas por 20 horas a 28 °C para permitir la adherencia celular. Previo a que transcurrieran las 20 horas de incubación se prepararon las diluciones de cada uno de los extractos virales anteriormente preparados con MCH (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} and 10^{-5} , 8 réplicas de cada una).

Transcurridas las 20 horas de sembrado de las placas, se observaron en el microscopio invertido corroborando adherencia celular y confluencia, en una campana de flujo laminar, donde cuidadosamente se retiró el medio de cultivo de las placas. Se agregó 100 μL de la dilución de extracto viral y se incubó 60 min, posteriormente se retiró el medio con WSSV y se agregó 200 μL de MCH, se regresaron las placas a incubación por 24 horas. Pasadas 24 horas, las placas fueron observadas en un microscopio invertido donde se cuantificó el número de pozos donde se observó efecto citopático (células redondeadas y presencia de espacios en la monocapa celular) para determinar la dilución LD50 a utilizar en los ensayos *in vitro* (Tabla II). Los títulos virales fueron expresados como Dosis Infecciosa en Cultivo de Tejido al 50% (DICT₅₀) para cada uno de las cinco cepas y es el dato utilizado para determinar la dilución adecuada para cada extracto viral.

Tabla II. Titulación de cinco cepas de WSSV en hemocitos de camarón utilizando el método de Reed y Muench (1938).

Cepa	Diluciones Log ¹⁰	Infectados	No infectados	Total	Porcentaje	Índice	TDICT50/mL
JP	1	7	1	8	87.5	0.50	10 ^{3.5}
	2	6	2	8	75		
	3	5	3	8	62.5		
	4	3	5	8	37.5		
	5	3	5	8	37.5		
LC10	1	7	1	8	87.5	0.50	10 ^{3.5}
	2	6	2	8	75		
	3	5	3	8	62.5		
	4	3	5	8	37.5		
	5	3	5	8	37.5		
LG	1	8	0	8	100	0.50	10 ^{3.5}
	2	7	5	8	87.5		
	3	5	3	8	62.5		
	4	3	5	8	37.5		
	5	1	6	8	12.5		
DVI	1	8	0	8	100	0.66	10 ^{2.6}
	2	6	2	8	75		
	3	4	6	8	50		
	4	3	5	8	37.5		
	5	1	7	8	12.5		
GVE05	1	8	0	8	100	0.50	10 ^{3.5}
	2	6	2	8	75		
	3	5	3	8	62.5		
	4	3	5	8	37.5		
	5	1	7	8	12.5		

6.10.5 Cultivo primario de hemocitos y reto con WSSV

A partir de los datos de cuantificación viral de los extractos de WSSV obtenidos por qPCR, se realizaron los cálculos para obtener el número de partículas virales para cada extracto diluido. Se preparó el cultivo primario de hemocitos utilizando placas de cultivo celular con fondo plano de 24 pozos conteniendo 1×10^6 células por pozo en 600 μL

siguiendo el procedimiento de extracción de hemocitos ya descrito, las placas se incubaron durante 20 horas a 28 °C. Se eliminó el medio cuidadosamente y se colocaron 300 µL de extracto diluido conteniendo: de JP $4.99 \times 10^{3.5}/\mu\text{L}$ copias virales, de LC10 $4.23 \times 10^{3.5}/\mu\text{L}$, de LG $1.03 \times 10^{2.5}/\mu\text{L}$, de GVE05 $1.04 \times 10^{2.5}/\mu\text{L}$ y $6.48 \times 10^{3.5}/\mu\text{L}$ copias virales de la cepa DVI manteniendo una fila como control negativo donde no se agregó extracto viral, las placas se incubaron durante 1 hora. Posteriormente se retiró el extracto viral y se agregaron 600 µL de MCH, las placas fueron regresadas a incubación y estas fueron muestreadas a 5 tiempos post-infección (1 hpi, 3 hpi, 6 hpi, 12 hpi y 24 hpi) manteniendo 4 réplicas en cada caso.

6.10.6 Extracción de ARN total a partir de células en monocapa

Terminado el tiempo post-infección correspondiente, las placas fueron llevadas a una campana de extracción. En cada pozo se retiró cuidadosamente el medio de cultivo y se añadió 300 µL de TRIzol Reagent (Invitrogen, USA), de manera inmediata se lavó con la pipeta y se transfirió el contenido a un tubo eppendorf. El proceso se realizó pozo por pozo y las muestras se almacenaron a -80 ° hasta su extracción.

Para la fase de separación, los tubos fueron descongelados y se incubaron 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas. Se añadieron 60 µL de cloroformo y se mezcló por inversión durante 15 s. Los tubos se incubaron en hielo por 2-3 min y posteriormente fueron centrifugados a 12 000 x *g* por 15 min a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa y se adicionaron 150 µL de isopropanol, se incubó a -70 °C por 30 min y posteriormente se mezcló con vortex. Los tubos fueron centrifugados a 12 000 x *g* por 20 min a 4 °C. El sobrenadante fue removido y el pellet fue lavado con 200 µL de etanol al 75 % mezclando bien con vortex para ser centrifugados nuevamente a 7000 x *g* por 10 min a 4 °C. Se retiró todo el sobrenadante, se dejó secar el pellet y finalmente se resuspendió en 20 µL de agua DEPC.

El ARN fue tratado con 2 U de RNase-free DNA I (Promega, Madison WI, USA) para remover el ADN residual. Se preparó un master mix con el kit de Promega RNase-Free

DNase de acuerdo al número de muestras de ARN a ser tratadas. El mix contenía 2 μ L de RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer y 2 μ L de RNase-Free DNase por muestra. Los tubos se incubaron a 37 °C por 30 min y posteriormente se transfirieron a hielo, se agregaron 2 μ L de DNase Stop Solution a cada uno y se incubaron a 65 °C por 10 min para inactivar la DNase y terminar la reacción.

6.10.7 Preparación de cDNA

La síntesis de cDNA se realizó mediante el sistema ImProm-IITM Reverse Transcription System (RT-PCR) de PROMEGA siguiendo las concentraciones del protocolo. Se desnaturalizó una mezcla aproximada de 1 μ g de ARN total y 0.5 μ g de oligonucleótido (dT) a 70 °C durante 5 min. Para la síntesis de cDNA se preparó una mezcla con 1 U de transcriptasa inversa ImProm-IITM, buffer ImProm-IITM 1X, 4 Mm MgCl₂, mezcla de dNTPs 0.5 Mm, 20 U de inhibidor de ribonucleasas Recombinant RNAsin y agua libre de RNAsas. La reacción se incubó durante 5 min a 25 °C y posteriormente se incubó a 42 °C durante 60 min, finalmente la enzima fue inactivada desnaturalizando la mezcla durante 15 min a 70 °C. Todas las muestras de cDNA fueron cuantificadas en nanodrop para verificar concentración y calidad y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Para confirmar que la síntesis de cDNA fue correcta, se amplificó el gen de β -actina para *L. vannamei* mediante PCR en todas las muestras. Oligos utilizados: β -actina FW 5' CCAGGAGACCACCTACAAC 3' y β -actina RW 5' AGCGAGGGCAGTGATTC 3'. Condiciones de amplificación: 95 °C/5 min \rightarrow 32X (95 °C/30 s \rightarrow 58 °C/50 s \rightarrow 70 °C/1 min) 4 °C/ ∞

6.10.8. Análisis de pcr cuantitativo en tiempo real

La expresión genica fue analizada por medio de PCR cuantitativo (qPCR) en placas ópticas de 96 pozos utilizando el termociclador Bio-Rad CFX384 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) y SensiFAST Sybr NO-rOX Mix (Bioline, England) en reacciones de 12 μ L. El protocolo de reacción fue: 98 °C/2 min \rightarrow 39X (95 °C/5 s \rightarrow 60 °C/ 15seg) incluyendo

además un ciclo de disociación de 65 °C/5 s y 95 °C/5 s. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado y se incluyeron controles sin templado en cada corrida para verificar que no hubiera contaminación de ADN. Los valores del ciclo umbral (Ct), el cual representa el ciclo de PCR en el que la señal de fluorescencia sobrepasa la fluorescencia basal (umbral o threshold), considerado como el punto en el cual la reacción de amplificación da comienzo, fueron estimados de acuerdo a la línea de fluorescencia autocalculada del software Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad, USA). Como control interno, se utilizó el gen de referencia de ATP sintasa Subunidad FO. La expresión de genes del sistema inmune y genes virales fue determinada como relativa a la expresión del control interno y fue calculada por medio del método 2^{-ddct} (Livak y Schmittgen, 2001) utilizando controles negativos en cada tratamiento (hpi) como calibradores. Las secuencias nucleotídicas utilizadas se indican en la tabla III.

Tabla III. Secuencias nucleotídicas de oligonucleotidos para cuantificación por PCR tiempo real.

Genes	Oligo sentido (5'-3')	Oligo antisentido (5'-3')
<i>Endogeno y relacionados al sistema inmune</i>		
-FO	CGTCGTTAGGTTAAGTGC GTT	TTTCAGCGCATTAAAGACGTGTT
- (PAP)	CTAGCCCCCTATCAAAGGAACTGC	GGATGCCAACATAGACTGATGCAC
- (MnSOD)	CGTTGGAGTGAAAGGCTCTG	GATTTGCAAGGGATCCTGGT
- (PRX)	TGGACCTCGCGGGAGAT	GACCGATAGCCACCATGCTT
<i>Expresión inmediata-temprana deWSSV</i>		
-IE1	TGGCACAACAACAGACCCTA	TGCATTATCTTCGAGCCAGA
-WSSV304	CCGGACGGAGACGTGATAAG	AGCCCTGTACAATGCCTTCC

6.11 análisis estadístico

Los resultados están expresados como valores promedio de los replicados \pm desviación estándar. Los valores fueron evaluados de manera inicial con un análisis de distribución normal y de homogeneidad de varianzas. Se realizaron comparaciones múltiples con la prueba no-paramétrica de Kruskal-Wallis y las diferencias entre cepas y tiempo post-infección con $p < 0.05$ fueron consideradas como significativas.

7. RESULTADOS

Se verificó la especificidad de los oligos diseñados mediante la amplificación de todas las secuencias cortas en una muestra de ADN viral. Después de verificar por PCR las amplificaciones cortas, se realizó la amplificación de fragmentos largos mediante combinación de los oligos sentido y antisentido contiguos (Fig. 5)

7.1 Amplificación de fragmentos largos para captura de ADN

Se logró la amplificación completa de las secuencias de nueve aislados de WSSV, seis correspondientes al estado de Sinaloa y tres del estado de Nayarit. En algunos casos, las amplificaciones de 20 Kb no fueron posibles y se debieron realizar varias combinaciones de oligonucleotidos hasta lograr que se cubriera completamente el genoma ya sea con amplificaciones de 10 Kb o en algunos casos de hasta 30 Kb. En la Fig. 6 se muestra uno de los geles de electroforesis obtenidos de la amplificación de secuencias pertenecientes a las cepas GVE05 y DVI.

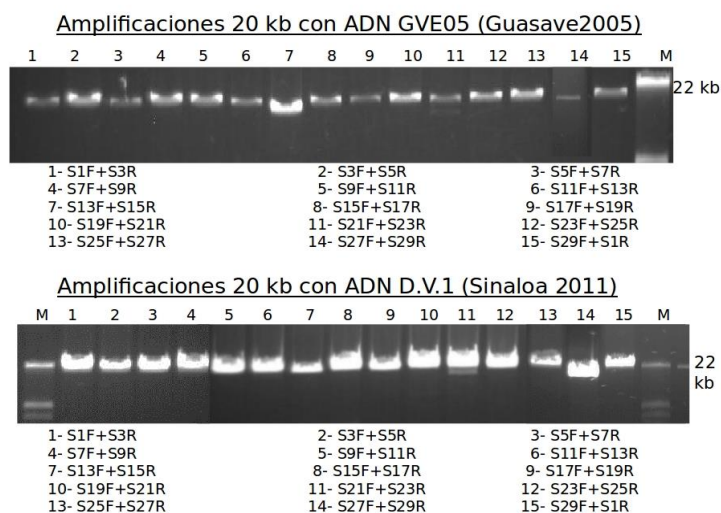


Figura 6. Amplificaciones de 20 kb correspondientes a las cepas GVE05 y DVI.

7.2 Librerías genéticas de ADN

Después de seguir los protocolos para la elaboración de las librerías genéticas que se analizarían en una primera corrida de secuenciación, éstas fueron observadas por electroforesis en gel de agarosa para verificar el tamaño y calidad de las mismas (Fig. 7). Las librerías que se prepararon para una segunda corrida de secuenciación fueron visualizadas con el sistema Experion de Biorad (Fig. 8).

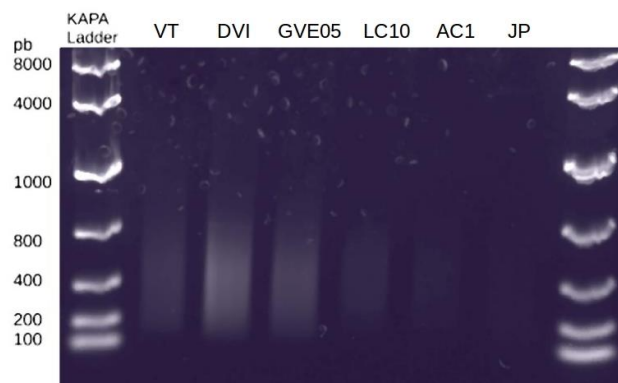


Figura 7. Gel de agarosa mostrando los productos de librerías fragmentadas correspondientes a cepas de WSSV seleccionadas por tamaño (~330 pb).

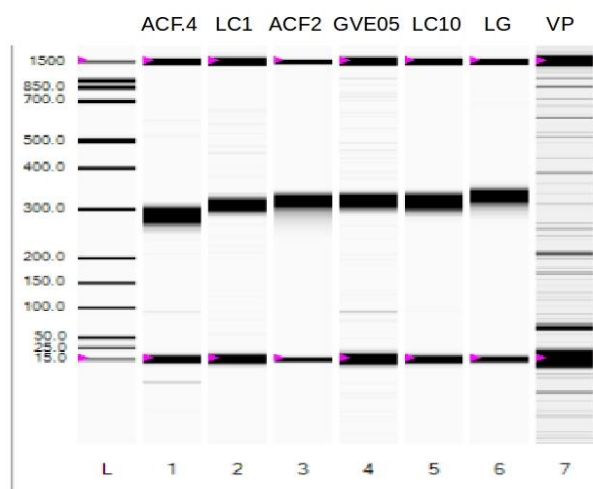


Figura 8. Gel virtual generado por Experion de BioRad mostrando los productos de las librerías fragmentadas de WSSV seleccionadas por tamaño (~330 pb).

7.3 Reporte de secuenciación

Para la primera corrida de secuenciación, la plataforma de Ion Torrent generó un reporte de corrida donde se menciona que el 94% del chip fue cargado pero el 76% de las lecturas resultaron ser policlonales, por lo que solo el 18% (215,712 lecturas) del total de lecturas generadas fueron válidas para uso posterior (Tabla IV).

Tabla IV. Datos obtenidos de la secuenciación de seis cepas de WSSV.

Muestras	A1_rawlib. fastq Cepa VT	A2_rawlib. fastq Cepa DVI	A3_rawlib. fastq Cepa GVE05	A4_rawlib. fastq Cepa LC10	A5_rawlib. fastq Cepa AC1	A6_rawlib. fastq Cepa JP
Lecturas obtenidas	45298	97017	15536	13465	45761	24585
Cobertura	4.7X	60.0X	9.1X	8.5X	26.8X	15.5X

Las librerías A1, A3 y A4 quedaron descartadas para su análisis posterior debido a la poca cobertura que se obtuvo. Para la segunda corrida de secuenciación, el reporte mencionó que el 91% del chip fue cargado y el 62% de las lecturas resultaron ser policlonales, por lo que solo el 31% (253,702 lecturas) del total de lecturas generadas son utilizables para su análisis (Tabla V).

Tabla V. Datos obtenidos de la secuenciación de seis cepas de WSSV en la segunda corrida de secuenciación.

Muestras	B1_rawlib. fastq Cepa ACF2	B2_rawlib. fastq Cepa ACF4	B3_rawlib. fastq Cepa LG	B4_rawlib. fastq Cepa LC1	B5_rawlib. fastq Cepa LC10	B6_rawlib. fastq Cepa GVE05
Lecturas obtenidas	45298	60660	43068	47688	61636	48727
Cobertura	33.4X	28.4X	27.1X	29.4X	38.7X	30X

Después de realizar la limpieza de secuencias con el programa Cutadapt, al analizar la calidad de las librerías, quedaron como se muestra en la tabla VI

Tabla VI. Datos obtenidos de las 9 librerías después de pasar por el proceso de limpieza y filtrado de lecturas.

	DVI	JP	AC1	ACF2	ACF4	LG	LC1	LC10	GVE05
Secuencias totales	85897	22770	41097	40695	53558	37525	42035	55400	42728
Tamaño de secuencias (pb)	50-300	50-300	50-300	50-300	50-300	50-300	50-300	50-300	50-300

7.4 Alineamiento de lecturas al genoma de referencia

Con los archivos de lecturas limpias, estas fueron alineadas al genoma de referencia con el programa Bowtie2 (Tabla VII):

Tabla VII. Resultados del alineamiento con el programa Bowtie2.

	DVI	AC1	JP	ACF2	ACF4	LG	LC1	LC10	GVE05
Lecturas no pareadas	85897	41097	22770	40695	53558	37525	42035	55400	42728
Alineadas 1 vez	80335	38151	21529	38597	49828	35200	39877	52200	39921
Alineadas > 1 vez	2420	1338	522	667	1022	645	609	991	777
% de lecturas alineadas	96.34	96.06	96.84	96.48	94.94	95.52	96.31	96.01	95.25

Se generaron gráficas de cobertura en R a partir de los archivos .sam obtenidos del mapeo al genoma de referencia con Bowtie2.

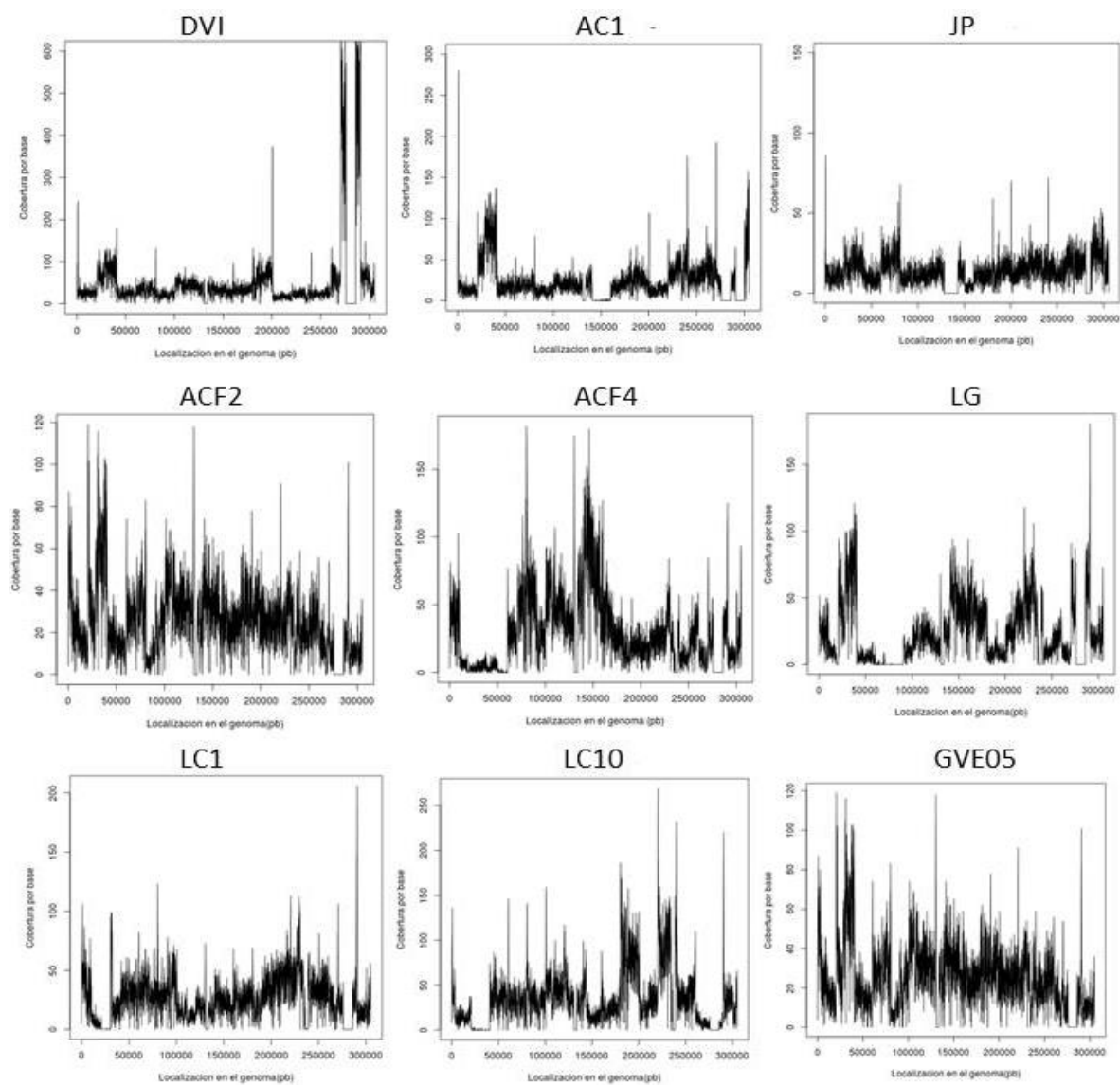


Figura 9. Gráficas de cobertura de las lecturas (reads) de las nueve cepas alineadas al genoma de referencia con Bowtie2.

Al realizar los gráficos de cobertura de las lecturas que se ensamblaron al genoma de referencia con el programa Bowtie2 se pudo observar que existen dos deleciones importantes correspondientes a la zona de 13000-133000 pb y 275000-280000 pb (Fig. 9).

El mapa generado por Anvi'o revela cuatro zonas distintas donde existe variabilidad, dos de ellas importantes, comparadas con el genoma de referencia WSSV-CN. En siete de las cepas, la zona de deleción bin 2 tiene un tamaño estimado de 2.7 Kb y está localizado en la zona 130-133 Kb del genoma de referencia, mientras que la zona de deleción bin 4 es un área de 10 Kb que está localizada en la posición 275-285 Kb (con respecto al genoma de referencia).

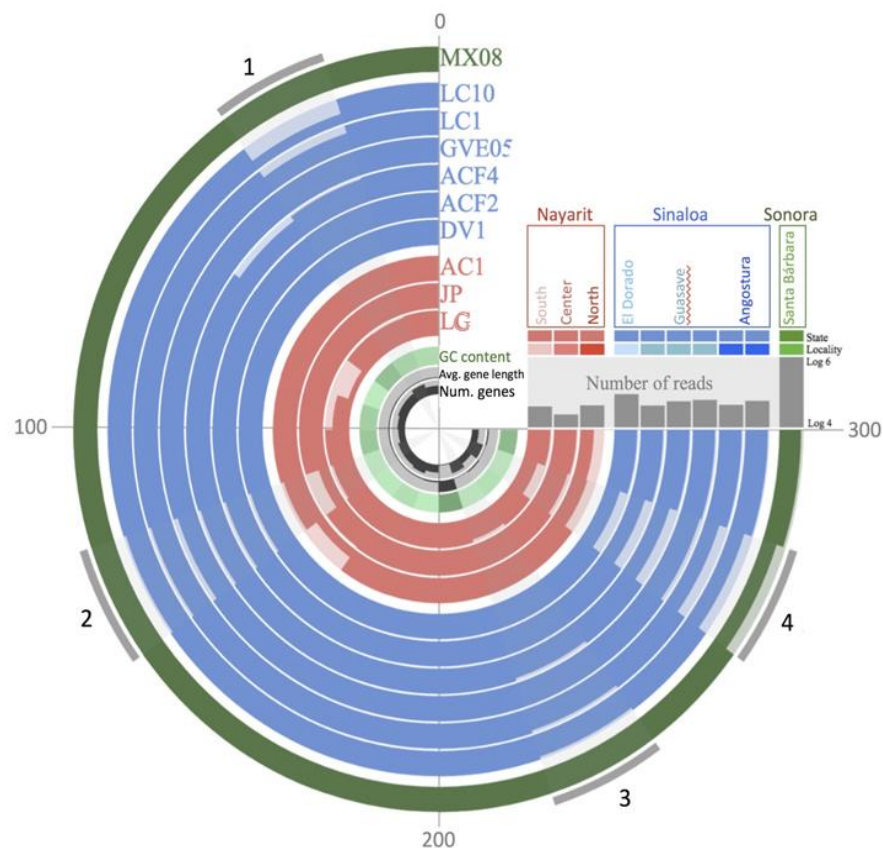


Figura 10. Representación semi-circular de 10 genomas de WSSV mexicanos mostrando regiones genómicas con variabilidad (variantes de nucleótidos sencillos, líneas grises 1-4). Número de lecturas en escala logarítmica base 10.

Al ensamblar y orientar la información de acuerdo al genoma referencia WSSV-China utilizando el programa AMOScmp se obtuvieron archivos con diferente número de contigs (Tabla VIII).

Tabla VIII. Número de contigs y tamaño del genoma preliminar obtenido del mapeo al genoma de referencia.

DVI	AC1	JP	ACF2	ACF4	LG	LC1	LC10	GVE05
290420	263174	283858	289110	274161	255005	276863	270375	258306
13 ctg	19 ctg	22 ctg	28 ctg	48 ctg	33 ctg	22 ctg	22 ctg	92 ctg

7.5 Alineamiento global de genomas preliminares contra genoma de referencia

Al formar un archivo continuo tipo fasta con los archivos preliminares de los genomas, se realizó el alineamiento en línea a través de la plataforma de EMBOSS utilizando el programa Stretcher para secuencias nucleotídicas de gran tamaño y obtuvimos los alineamientos globales de los genomas preliminares de los aislados virales secuenciados alineadas contra el genoma referencia de China (305, 287 pb).

Para el aislado DVI, el programa calculó un tamaño de 290,420 pb, 94.8 % de similitud y 5.1 % de gaps al alinear contra el genoma de WSSV-China, en el aislado AC1 se estimó un tamaño de 263,174 pb y 86.1 % de similitud debido al elevado porcentaje de gaps (13.9 %). Para el caso de J.P., a pesar tener menor número de lecturas, el programa le estimó un tamaño de 283,858 pb, 92.6 % de similitud y 7.4 % de gaps. En el caso del aislado ACF2, se le estimó un tamaño de 289,110 pb y un porcentaje de similitud de 94.7 %, el aislado ACF4 presentó un tamaño de 274,161 pb además de 90.5 % de similitud al genoma de referencia. Para el aislado LG, el alineamiento global le estimó el menor tamaño, 255,005 pb y el menor % de similitud, 84.1 %. Al aislado LC1 le fue estimado un tamaño de 276,863 pb y 90.8% de similitud, LC10 obtuvo un tamaño de 270,375 pb y 88.1

% de similitud. Finalmente, a la muestra más antigua GVE05, le fue estimado un tamaño de 258,306 pb y 87.9 % de similitud al genoma de referencia.

Siete de las variantes del virus analizadas comparten una delección de ~ 3000 pb en la región de 130,800-133,700 pb al alinear contra el genoma de WSSV-China, el aislado JP y el GVE05 difieren del resto al presentar una delección de 14 Kb y 9 Kb respectivamente en esta posición. Una segunda delección fue observada en todos los aislados secuenciados, esta es una gran delección de casi 10 Kb ubicada en la posición 275 Kb de genoma de referencia en ocho de los aislados analizados, el aislado JP y el GVE05 presentaron una delección notablemente más corta (4 y 5.7 Kb respectivamente).

7.6 Anotación de genomas draft con genome transfer utility (GATU)

El resumen de las estadísticas de los ensamblajes y números de acceso Genbank de las cepas anotadas con GATU se indican en la tabla IX. Las estadísticas de los resultados de la transferencia de anotación del genoma WSSV-China hacia el aislado DVI indican que el número de anotaciones con 100 % de similitud es de 373, 60 con 100-95 % y 55 anotaciones con <70 % de similitud. En el aislado AC1 se encontraron 329 anotaciones con 100 % de similitud, 49 con 100-95 % y 65 con <70 % de similitud, para JP se encontraron 330 anotaciones con 100 % de similitud, 42 con 100-95 % y 91 con 70 %.

Para el aislado ACF2 se encontraron 355 anotaciones con 100 % de similitud, 54 con 100-95 % y 31 con <70 % de similitud, ACF4 presentó sólo 295 anotaciones con 100 % de similitud y 50 del 100-95 %. En el aislado LG, también se encontraron 295 anotaciones con 100 % de similitud y sólo 44 con 100-95 %. Para LC1, se encontró que 339 presentaron 100 % de similitud, 52 presentaron 100-95 % y 31 más de 70 % de similitud. En el aislado LC10 el programa indicó 322 anotaciones con 100 % de similitud y 55 con 100-95 %. Finalmente, en el aislado GVE05 se encontró que solamente 274 anotaciones presentaron 100 de similitud y 43 100-95 %.

Utilizando el comando Info seq se obtuvo que los genomas preliminares poseen un porcentaje de GC de 41% al igual que los genomas de referencia publicados (41.01 %) con ORFs representados en ambas cadenas e igual proporción.

Al comparar la anotación del genoma WSSV-China contra el genoma de los aislados analizados se encontraron varias deleciones (Figs. 11-19), se observa un bajo porcentaje de similitud en las secuencias de wsv128 y wsv129 (10.2 y 8.4 % respectivamente), en la traducción conceptual de la secuencia codificante wsv178 de China (correspondiente a ORF94), existe una secuencia repetida 12 veces (AAPPEDEEEDDFYRKKR), la cual solo se repite 5 veces en los genomas preliminares analizados, también se encontró una deleción de 2774 pb que corresponde a WSV237-243 en siete de los nueve aislados. A diferencia del resto de los aislados secuenciados, la primera deleción fue mayor, para JP es de 14 Kb y corresponde a las regiones codificantes wsv238-249 (Fig. 14) además del aislado GVE05 donde la deleción es de 8.8 kb (WSV 234-249) (Fig. 20). Para todos los genomas, además existe reducción de la secuencia de wsv360 en todos los aislados la cual se menciona como el fragmento más largo del genoma de referencia wsv360, en este caso paso de 10 Kb a 4 Kb en todos los casos analizados (Figs. 12-20). La deleción más grande la encontramos en la región 7 de casi todos los genomas preliminares analizados comparando con el genoma de WSSV-China, la cual corresponde a la sección que se ubica de 275880-285805 pb (10 Kb), esta deleción representa la pérdida de 19-21 ORFs (ausencia de wsv479-498). En el genoma de la variante JP y GVE05, La deleción es considerablemente menor, 4 y 5.8 Kb respectivamente en esta región correspondiente a las secuencias codificantes WSV 489, 496 y 498 de JP y WSV 487-502 en GVE05.

Tabla IX. Resumen de estadísticas del ensamble con AMOScmp usando WSSV-CN como referencia y números de acceso Genbank para las cepas anotadas con GATU.

Cepa	Secuencias	No de contigs	Contig más largo	Genoma total bp	Acceso Genbank
GVE05	42,728	92	33,650	272,607	MG432478
ACF2	40,695	28	50,581	289,870	MG432475
ACF4	53,558	47	47,166	277,297	MG432476
LC1	42,035	22	42,852	278,223	MG432481
LC10	55,400	22	42,757	270,274	MG432480
DVI	85,897	12	61,024	290,879	MG432477
AC1	41,097	23	32,988	263,174	MG432474
JP	22,770	18	59,167	283,858	MG432479
LG	37,525	33	54,448	257,675	MG432482

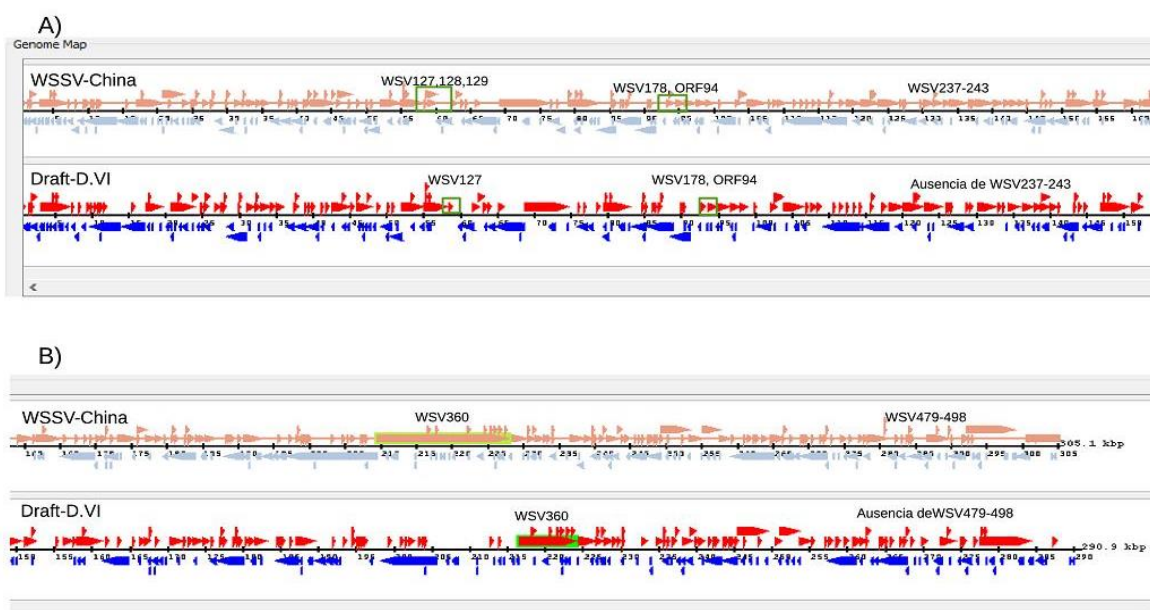


Figura 11. Mapa lineal del genoma de WSSV-China y el genoma DVI A) Está representado el fragmento de 0-150 Kb, B) el de 150-305 Kb. Los ORFs transcritos en la dirección sentido están indicados arriba y los ORFs transcritos en la dirección antisentido abajo.

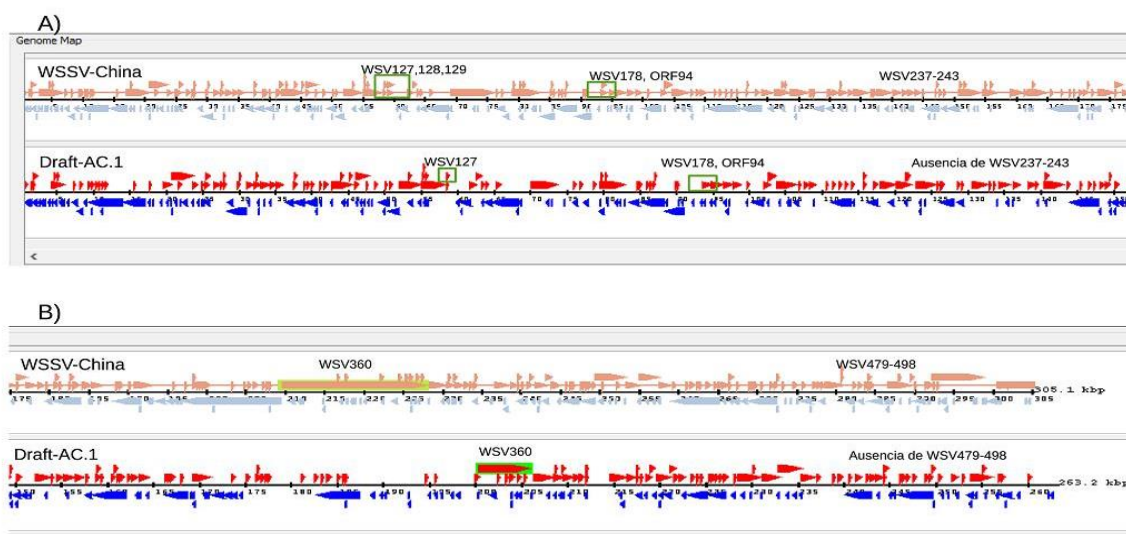


Figura 12. Mapa lineal del genoma de WSSV-China y el genoma AC1. A) Está representado el fragmento de 0-150 Kb, B) el de 150-305 Kb. Los ORFs transcritos en la dirección sentido están indicados arriba y los ORFs transcritos en la dirección antisentido abajo.

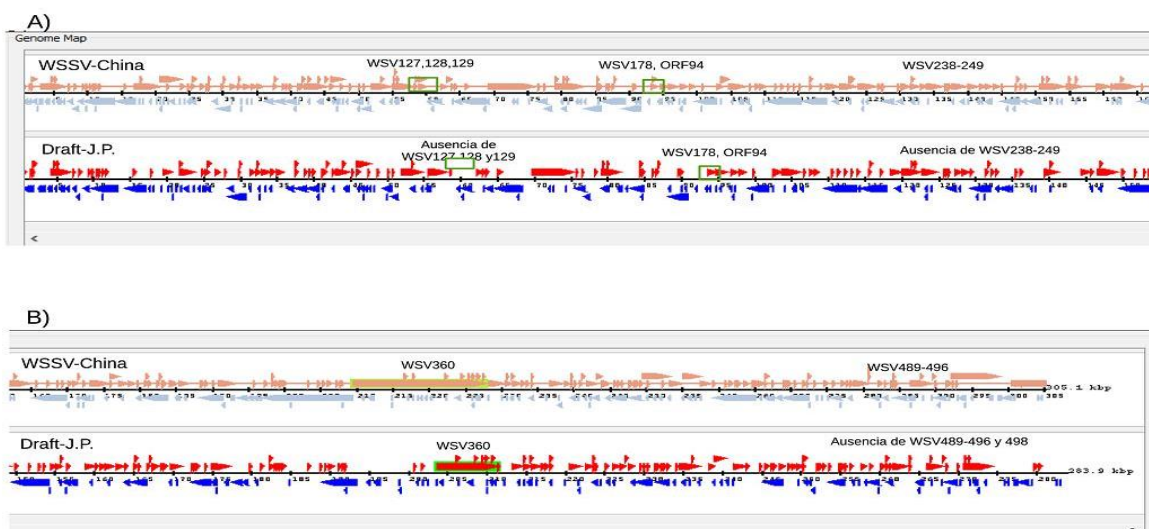


Figura 13. Mapa lineal del genoma de WSSV-China y el genoma JP. A) Está representado el fragmento de 0-150 Kb, B) el de 150-305 Kb. Los ORFs transcritos en la dirección sentido están indicados arriba y los ORFs transcritos en la dirección antisentido abajo.

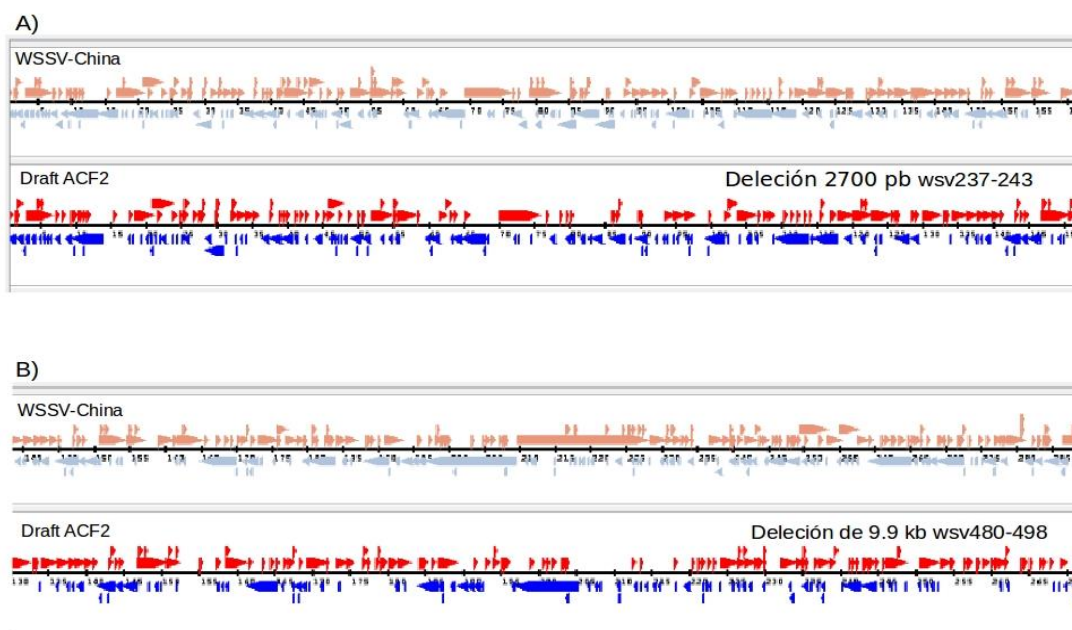


Figura 14. Mapa linear del genoma de WSSV-China y el genoma ACF2. A) Está representado el fragmento de 0-150 Kb, B) el de 150-305 Kb. Los ORFs transcritos en la dirección sentido están indicados arriba y los ORFs transcritos en la dirección antisentido abajo.

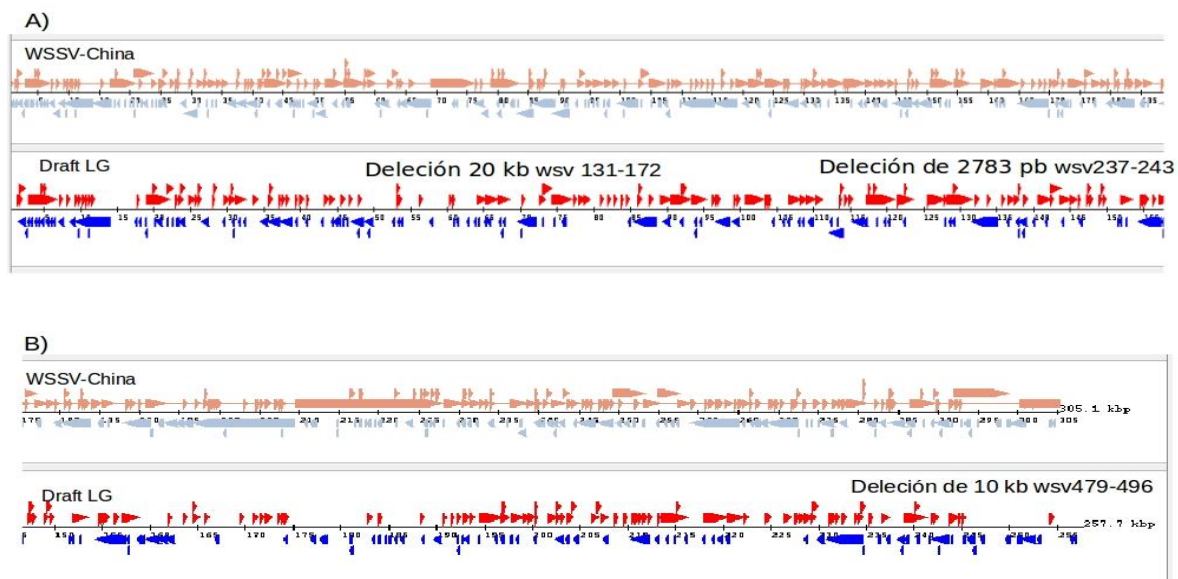


Figura 15. Mapa linear del genoma de WSSV-China y el genoma LG. A) Está representado el fragmento de 0-150 Kb, B) el de 150-305 Kb. Los ORFs transcritos en la dirección sentido están indicados arriba y los ORFs transcritos en la dirección antisentido abajo.

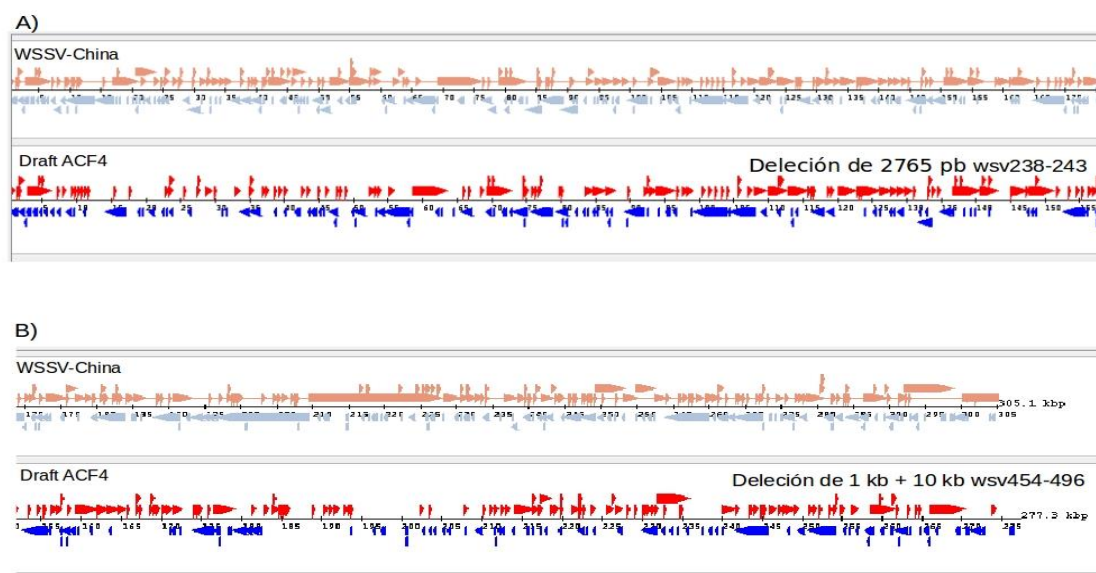


Figura 16. Mapa linear del genoma de WSSV-China y el genoma ACF4. A) Está representado el fragmento de 0-150 Kb, B) el de 150-305 Kb. Los ORFs transcritos en la dirección sentido están indicados arriba y los ORFs transcritos en la dirección antisentido abajo.

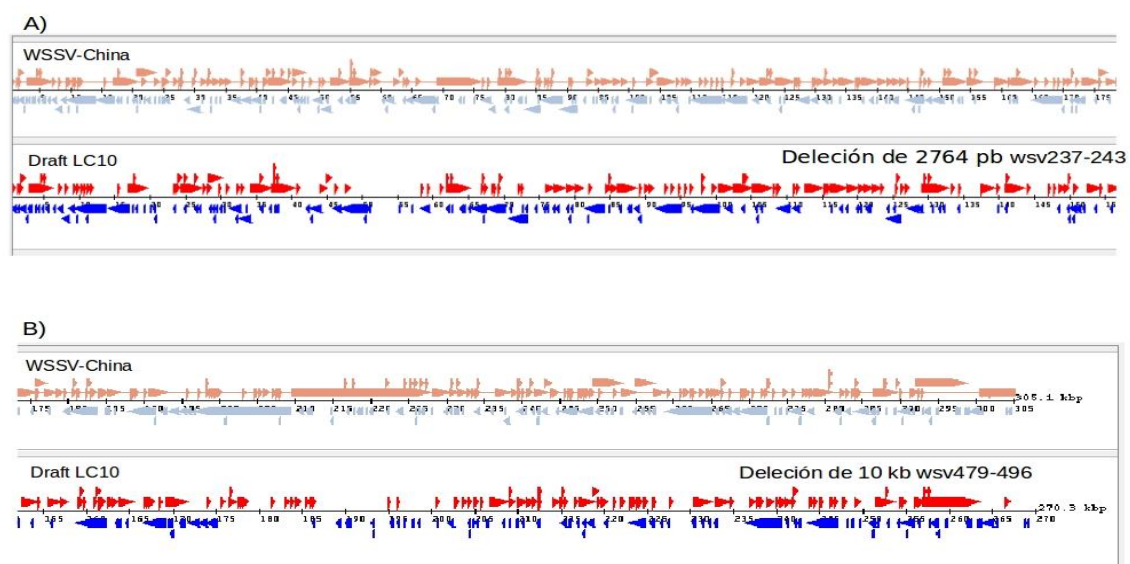


Figura 17. Mapa linear del genoma de WSSV-China y el genoma LC10. A) Está representado el fragmento de 0-150 Kb, B) el de 150-305 Kb. Los ORFs transcritos en la dirección sentido están indicados arriba y los ORFs transcritos en la dirección antisentido abajo.

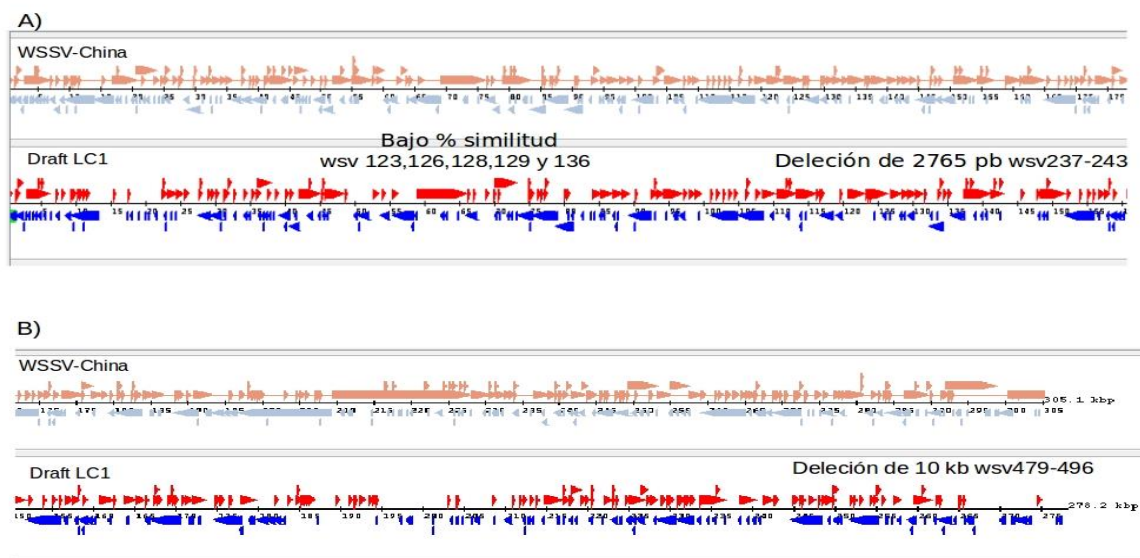


Figura 18. Mapa lineal del genoma de WSSV-China y el genoma LC1. A) Está representado el fragmento de 0-150 Kb, B) el de 150-305 Kb. Los ORFs transcritos en la dirección sentido están indicados arriba y los ORFs transcritos en la dirección antisentido abajo.

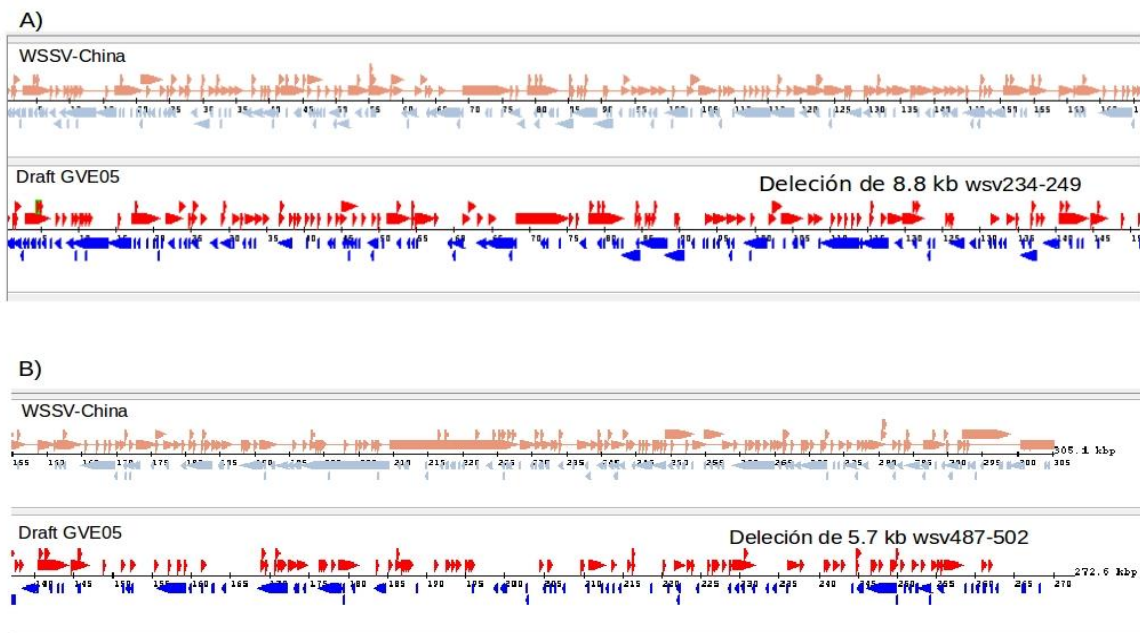


Figura 19. Mapa lineal del genoma de WSSV-China y el genoma GVE05. A) Está representado el fragmento de 0-150 Kb, B) el de 150-305 Kb. Los ORFs transcritos en la dirección sentido están indicados arriba y los ORFs transcritos en la dirección antisentido abajo.

7.7 Análisis filogenético

Para mostrar el grado de identidad de 14 genomas completos de WSSV fueron alineados para la reconstrucción de un árbol filogenético, cinco genomas son los previamente reportados y nueve aislados de los estados de Sinaloa y Nayarit (Fig. 20). El árbol muestra que WSSV-CN está cercanamente relacionado a cuatro aislados de Sinaloa (ACF4, LC1, LC10, and DVI). WSSV-TH está relacionado al aislado de Sonora WSSV-MX08, El aislado de Tecuala, Nayarit AC1 además de GVE05 aislado de Guasave, Sinaloa, están relacionados a WSSV-TW.

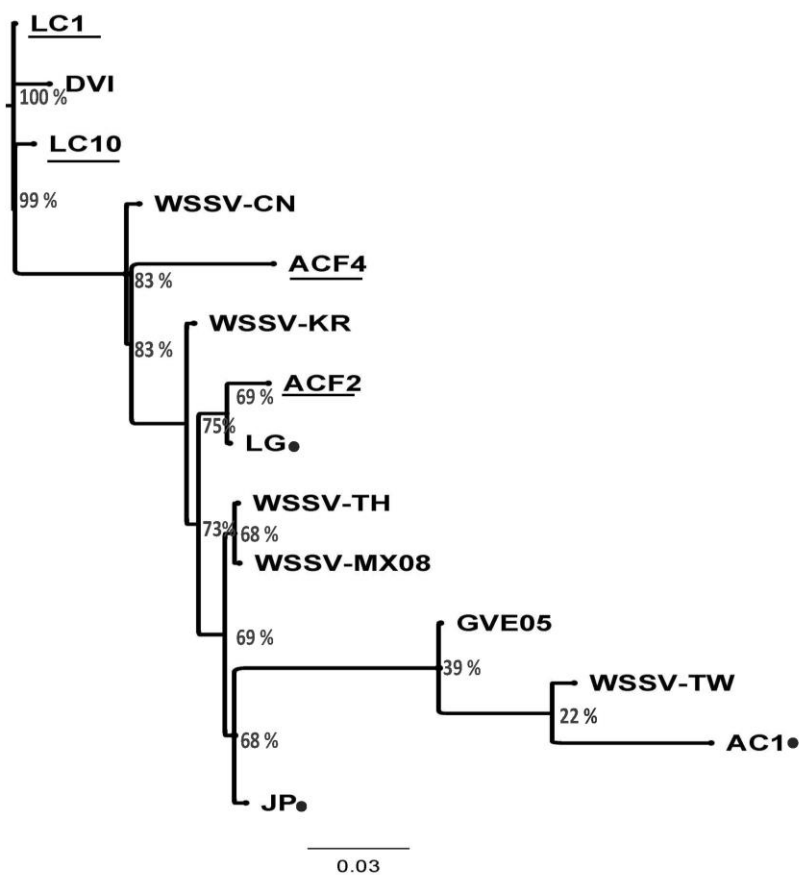


Figura 20. Árbol filogenético con 14 genomas completos de WSSV. Las líneas indican cepas del norte de Sinaloa y las viñetas indican cepas de Nayarit.

7.8 Sintenia de genomas

Se realizó un alineamiento de todos los genomas secuenciados con el sistema Mauve utilizando WSSV-MX08 como referencia. Para el mapeo y alineamiento fue seleccionado Mauve en progressive mode el cual revela varias zonas conectadas, los segmentos conservados son referidos como bloques colineares (LCBs) y están unidos por líneas (Fig. 21)



Figura 21. Comparación de genomas completos entre WSSV-MX08 y aislados de Sinaloa y Nayarit utilizando el algoritmo de Mauve progresivo y parámetros default. Cada bloque representa una región alineada hacia su contraparte igual en otro genoma.

Todos los aislados secuenciados fueron similares con respecto a la estructura del genoma y compartieron sintenia. Los genomas de las cepas ACF2, ACF4, LC1 y LC10 fueron colineares en tamaño, estos aislados provienen de la zona norte de Sinaloa. Con respecto a WSSV-MX08, el alineamiento con Mauve revela una gran delección en los genomas ACF4 y AC1, además el genoma de JP presenta una zona que no está presente en el resto de los aislados secuenciados.

7.9 Comparación circular con mapa de brig

La comparación circular y análisis de los 14 genomas completos a detalle fue realizada con el programa BRIG (Fig. 22). En este caso se muestra la similitud entre la secuencia referencia central (WSSV-CN), WSSV-TH, WSSV-TW, WSSV-KR, WSSV-MX08 y los nueve genomas de Sinaloa y Nayarit como círculos concéntricos. El porcentaje de similitud va del 70-100% coloreando de más claro a oscuro de acuerdo con la escala graduada a la derecha de la imagen circular. Similitud de menos de 70% aparecen como espacios en blanco.

El mapa muestra una primera zona de variabilidad en las cepas ACF4, LC1 y LC10 que corresponde a varias proteínas hipotéticas y dos RNA metiltransferasas de acuerdo a la anotación de WSSV-MX08. El genoma LG es el que presenta la mayor cantidad de genes fragmentados y baja similitud comparada con los cinco genomas publicados. La mayor variabilidad fue observada entre 60-100 Kb, correspondiente a una proteína flagelar, una reductasa y proteínas hipotéticas de función desconocida. La zona de delecciones correspondiente a la posición 130-133 Kb de las cepas secuenciadas corresponde a WSV237-WSV243 (de acuerdo a la anotación WSSV-CN) y a ORF89 (de acuerdo a la anotación WSSV-TH). Esta zona a partir de WSV237 se observa extendida y con baja similitud en los aislados JP y AC1 del estado de Nayarit.

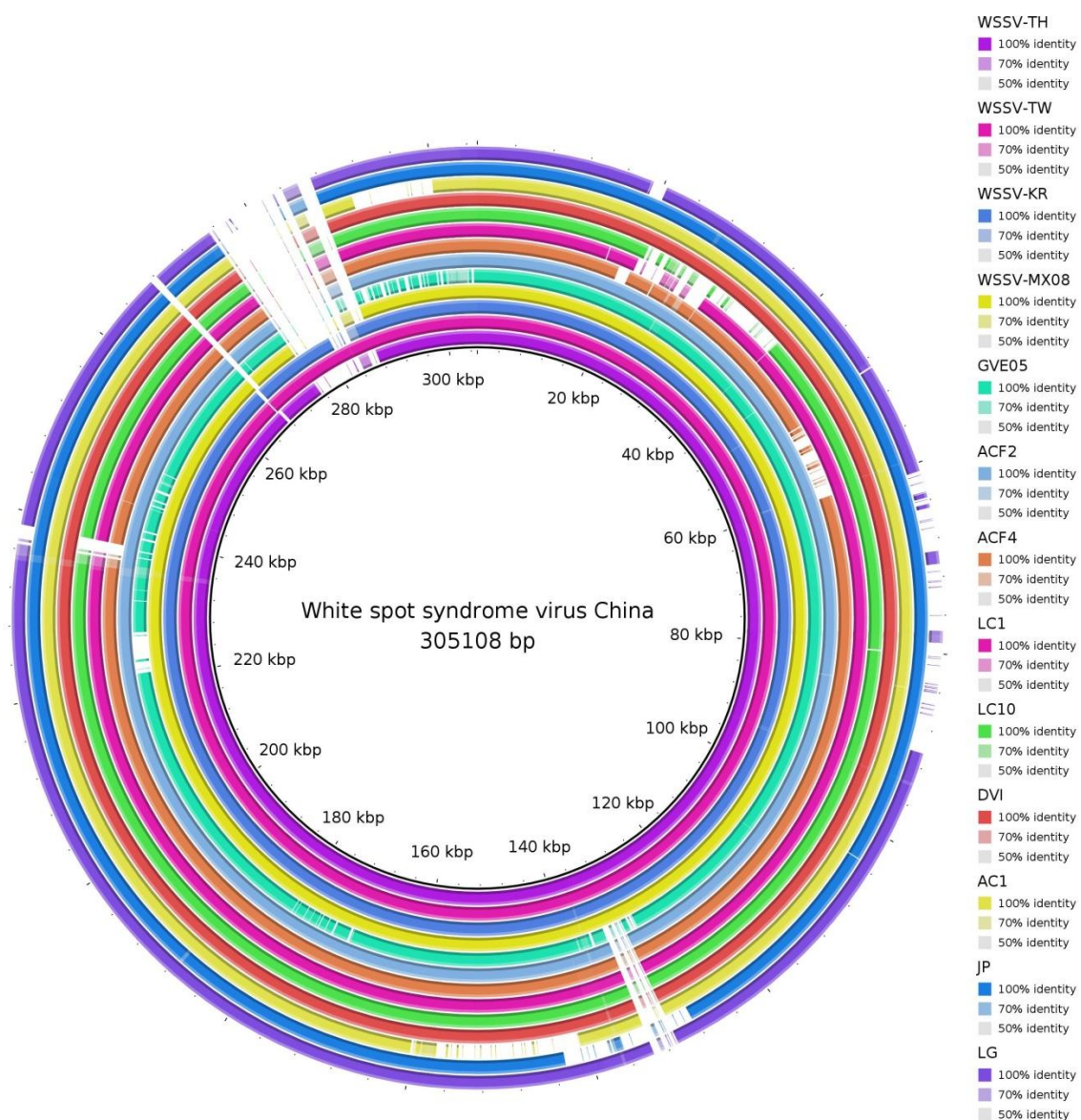


Figura 22. Visualización global con BRIG de genomas de WSSV aislados del Noroeste de México. El anillo central representa el genoma de referencia WSSV-CN, WSSV-TH, WSSV-TW, WSSV-KR y WSSV-MX08. GVE05 (SIN.2005), ACF2, ACF4, LC1, LC10 y DVI (SIN) y AC1, JP y LG (NAY)..

7.10 Cultivo *in vitro* como modelo de expresión de WSSV

Las cepas de WSSV seleccionadas por sus características para verificar su respuesta en el hospedero mediante un cultivo *in vitro* se enlistan en la Tabla X. El grado de virulencia es un estimado obtenido a partir de los datos observados en campo y la mortalidad observada en dos bioensayos en laboratorio.

Tabla X. Descripción de las cepas de WSSV aisladas de *L. vannamei* utilizadas para el reto *in vitro*.

Cepa de WSSV	Virulencia	Delección en la posición 130 y 275 kb	Tamaño de genoma (pb)
JP	Alta	4 Kb, 2.2 Kb	283,858
LC10	Baja	2.7 Kb, 9.9 Kb	270,274
LG	Alta	2.7 Kb, 9.9 Kb	257,675
GVE05	Moderada	8.8 Kb, 5.7 Kb	272,607
DVI	Moderada	2.7 Kb, 9.9 Kb	290,879

7.11 Expresión genética

A fin de determinar la respuesta a nivel celular de *L. vannamei* ante cepas de WSSV con diferentes grado de virulencia, se realizaron ensayos *in vitro* con hemocitos infectados y analizados a 1, 3, 6, 12 y 24 hpi. Fue analizada la expresión genética de la proteína activadora de fagocitosis (phagocytosis activating protein, PAP), para evaluar la respuesta fagocítica, superóxido dismutasa dependiente de manganeso (manganese superoxide dismutase, MnSOD) y peroxiredoxina (PRX) como una respuesta a la infección viral además se evaluaron dos genes de respuesta inmediata-temprana de WSSV, IE1 y WSSV304 los cuales son genes cruciales en la patogénesis de WSSV y de respuesta inmediata.

7.11.1 Expresión de genes relacionados al sistema inmune

La máxima expresión de PAP (Fig. 23) con las cinco cepas analizadas fue detectada a las 3 hpi. Al realizar la comparación estadística entre horas, la expresión de PAP con la cepa JP fue significativamente diferente entre 3 y 12 hpi, la expresión de PAP con la cepa LC10 fue significativamente diferente entre 3 y 6 hpi con la cepa LG la expresión a 3 hpi resultó estadísticamente diferente de la expresión a 24 hpi. Se observó que los niveles en la expresión de PAP fueron similares durante el período de 6 a 24 hpi. Comparando entre cepas, se observaron diferencias estadísticas en la expresión de PAP a 1 hpi entre las cepas JP y GVE ($p < 0.05$). A las 3 hpi, se observaron diferencias en la expresión genética de PAP entre cepas aunque debido probablemente a la alta variabilidad, no fueron estadísticamente significativas.

Al analizar la expresión genética de MnSOD (Fig. 24) se observó una respuesta temprana, a 1 hpi se encontraron los valores más elevados de expresión, posteriormente los niveles de expresión decayeron y permanecieron estables durante el resto del experimento. Comparando entre horas, la cepa LG indujo niveles de expresión significativamente más elevados y estadísticamente diferentes de los encontrados a 24 hpi ($p < 0.05$). Al realizar los análisis estadísticos entre cepas, solo se observaron diferencias significativas a 1 hpi entre las cepas LC10 y LG.

Las diferencias en los niveles de expresión de PRX en hemocitos después de la inoculación con WSSV se observan en la figura 25. Los niveles de expresión de PRX se incrementaron a las 3 hpi y decrecieron a las 24 hpi hasta su menor nivel de expresión. Al realizar la comparación estadística entre horas, se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de PRX con las cepas JP, LC10, LG y GVE05 ($p < 0.05$). Se encontraron diferencias significativas a 1 hpi, 3 hpi y 24 hpi al comparar los niveles de expresión de PRX entre cepas. La infección con las cepas JP y GVE05 mostró diferencias a 1 hpi, las cepas LC10 y DVI fueron diferentes a 3 hpi y las cepas JP y DVI fueron diferentes a 24 hpi ($p < 0.05$).

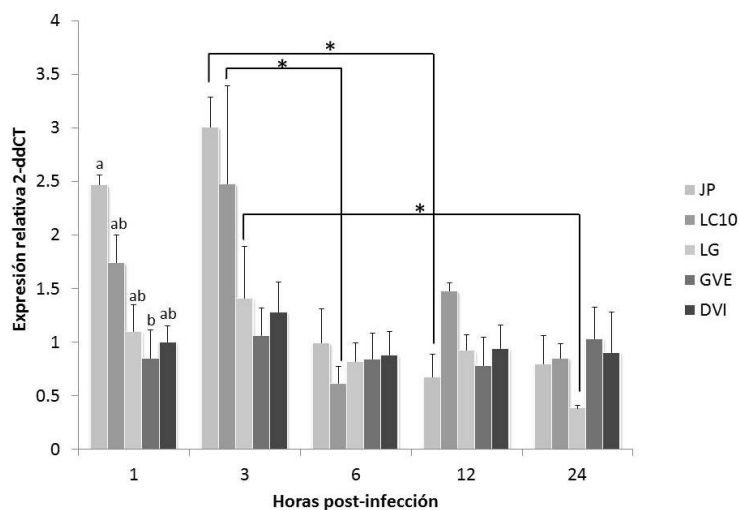


Figura 23. Expresión relativa de PAP en un cultivo in vitro de hemocitos de *L. vannamei* infectado con las cepas de WSSV JP, LC10, LG, GVE y DVI. Barras representan valores medios con error estándar. Diferencias estadísticas entre horas se indican con asterisco y las diferencias entre cepas se indican con letras.

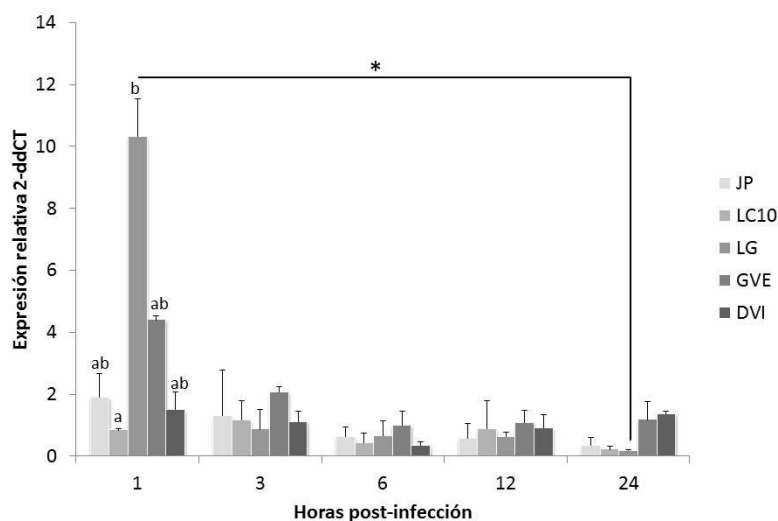


Figura 24. Expresión relativa de MnSOD en un cultivo in vitro de hemocitos de *L. vannamei* infectado con las cepas de WSSV JP, LC10, LG, GVE y DVI. Las barras representan valores medios con error estándar. Diferencias estadísticas entre horas se indican con asterisco y diferencias entre cepas se indican con letras.

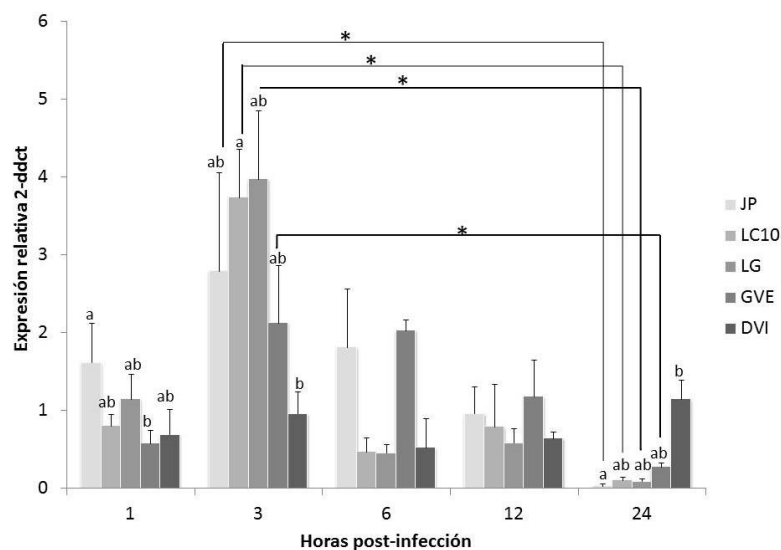


Figura 25. Expresión relativa de PRX en un cultivo *in vitro* de hemocitos de *L. vannamei* infectado con las cepas de WSSV JP, LC10, LG, GVE y DVI. Las barras representan valores medios con error estándar. Diferencias estadísticas entre horas se indican con asterisco y las diferencias entre cepas se indican con letras.

7.11.2 Expresión de genes tempranos de WSSV

Para investigar *in vitro* la expresión de genes tempranos de WSSV, fueron seleccionados y cuantificados IE1 y WSSV304. Se observó que la expresión de IE1 fue inducida desde la primera hora post-infección (Fig. 26). Comparando entre horas post-infección, se observaron diferencias en la cepa LC10 en la cual los niveles de expresión de IE1 a 3 hpi y 6 hpi fueron estadísticamente diferentes observándose un evidente decremento. Se observaron diferencias a 24 hpi en los niveles de expresión de IE1 entre las cepa LC10 y GVE05. A pesar de que en la cepa DVI se observa que IE1 es sobreexpresado a 12 y 24 hpi, se observó elevada variación individual.

La expresión de WSSV304 fue detectada desde 1 hpi (Fig. 27). Al comparar entre horas, la expresión de WSSV304 fue significativamente mas alta a 1 hpi en la cepa LG que en la cepa GVE05 ($p < 0.05$). Se observó un incremento en la expresión de WSSV304 en la cepa DVI a 12 hpi el cual fue estadísticamente diferente de la expresión a 3 hpi. Se encontraron diferencias comparando la expresión de WSSV304 entre cepas, la expresión

genética en la cepa LG fue significativamente más baja que la detectada en la cepa DVI a 12 hpi; también, la expresión de WSSV304 en la cepa JP fue mas baja que la expresión en DVI a 24 hpi.

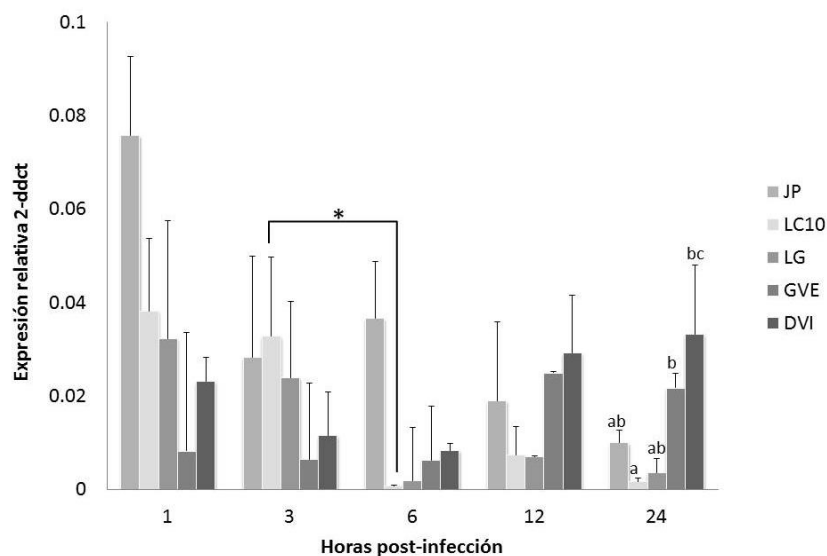


Figura 26. Expresión relativa de IE1 en un cultivo in vitro de hemocitos de *L. vannamei* infectado con las cepas de WSSV JP, LC10, LG, GVE y DVI. Las barras representan valores medios con error estándar. Diferencias estadísticas entre horas se indican con asterisco y diferencias entre cepas se indican con letras.

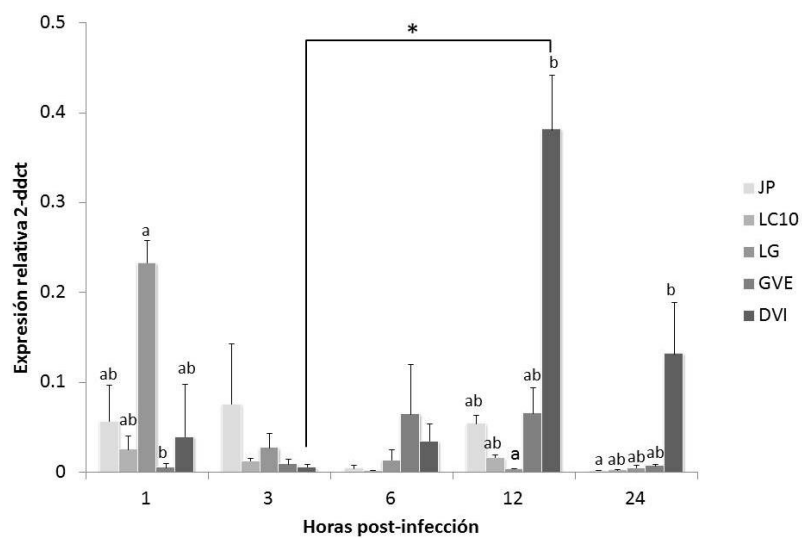


Figura 27. Expresión relativa de WSS304 en un cultivo in vitro de hemocitos de *L. vannamei* infectado con las cepas de WSSV JP, LC10, LG, GVE y DVI. Las barras representan valores medios con error estándar. Diferencias estadísticas entre horas se indican con asterisco y diferencias entre cepas se indican con letras.

8. DISCUSIÓN

La investigación genómica en microorganismos que afectan la industria de acuicultura ha atraído la atención en años recientes debido a la expansión global de la industria y la emergencia de enfermedades virales que afectan el desarrollo de la misma (Chakraborty y Ghosh 2014; Dieu *et al.*, 2004; Lightner *et al.*, 2012). El virus de mancha blanca es un patógeno importante en la industria debido a la dispersión global que presenta actualmente, el hecho de haberse caracterizado varios aislados en el mundo crea la necesidad de identificar las variantes que se presentan en la productiva región noroeste de México la cual ha sufrido importantes eventos de mortalidad desde hace más de 20 años, para estos eventos se registra diferente porcentaje de mortalidad lo que evidencia la heterogeneidad que puede existir en el genoma de este virus. Se cree que los grandes virus de ADN exhiben mínima variación genética aunque ni la frecuencia de sus variantes ni su importancia biológica son conocidas (Depledge *et al.*, 2011).

Tratando de examinar parte de estas interrogantes, se exploraron a partir de secuenciación por NGS, el genoma completo y las regiones más variables del virus de mancha blanca en muestras del noroeste de México. El tamaño del genoma de las cepas analizadas de WSSV fluctuó de 257,675 a 290,879 pb (cepas LG y DVI respectivamente), lo que evidencia la variabilidad presente en este virus. Reportes previos han propuesto que el encogimiento en WSSV es un proceso evolutivo, adaptativo que otorga una ventaja en la replicación además de aumentar su *fitness* y virulencia (Gao *et al.*, 2014; Marks *et al.*, 2004; Zwart *et al.*, 2010). Aunque la relación entre tamaño de genoma y virulencia no se ha definido claramente, se sugiere que los aislados con mayor virulencia pudieran mantener factores asociados a virulencia que podrían estar ausentes o sin función en aquellos aislados menos virulentos (Li *et al.*, 2016).

Captura de ADN viral por medio de amplificación por long-PCRs

La diversidad de las poblaciones de virus desde hace algunos años se ha estado monitoreando a través de estudios con plataformas de secuenciación de siguiente generación (NGS). Las nuevas metodologías permiten detectar variantes significativas en la población ya que los estudios en donde se secuenciaban regiones específicas ahora están tratando de estimar la diversidad a través de todo el genoma, lo que genera nuevo conocimiento sobre la función de genes virales poco estudiados. La secuenciación de genomas permite un entendimiento global de la patogénesis viral y la tecnología NGS es una manera altamente eficiente de secuenciar genomas virales completos y además generar alineamientos profundos de genomas virales en toda su longitud (Radford *et al.*, 2012). A pesar de la pequeña proporción de ADN viral comparado con el ADN del hospedero, la captura de los ácidos nucleicos de interés por medio de amplificación y purificación produjo resultados de calidad que posteriormente pudieron ser secuenciados por NGS (Beerenwinkel *et al.*, 2012; Uribe-Convers *et al.*, 2014) El uso de esta tecnología permite secuenciar varios genomas virales en una sola corrida, ensamblar los genomas totales y realizar inferencias en diversidad viral en un sólo experimento, superior a aquellos generados con otras aproximaciones, como son las metodologías basadas en cultivo y PCR (Depledge *et al.*, 2011). La metodología empleada –basada en la captura de ADN por medio de la amplificación de fragmentos long-PCRs- tiene la ventaja de ser aplicable a varias muestras y a un amplio rango de virus en el cual el ADN existe en bajas cantidades.

Variación entre cepas

Las variaciones en tamaño de genoma se deben principalmente a deleciones localizadas en regiones genómicas variables. Se observaron dos regiones con evidentes deleciones, la ubicada en la última región del genoma (región 7) es la que presenta la deleción más grande, en siete de las cepas analizadas (ACF2, ACF4, LC1, LC10, DVI, AC1 y LG). En esta región se encontró que en la mayoría de las muestras existe una deleción de

casi 10 kb que corresponde a ORF 23/24, comparando con el genoma de WSSV-China, esta región representa 19 CDS (wsv481-wsv497), y ha sido identificada previamente en muestras aisladas de Vietnam, India y Corea (Chai *et al.*, 2013; Dieu *et al.*, 2004; Pradeep *et al.*, 2008; Shekar *et al.*, 2012). Esta similitud sugiere una relación entre las cepas de WSSV de México y las cepas ancestrales asiáticas, en este caso, la mayoría de éstas secuencias no presentan similitud con proteínas caracterizadas y ninguna codifica para proteínas conocidas involucradas en la infección. En las cepas de WSSV, JP y GVE05, la delección es menor y en el caso de JP sólo representa la pérdida de 9 ORFs (CDS wsv489-wsv496 y wsv498), la delección de 5.7 Kb (cepa GVE05) y de 4.6 Kb (cepa JP) observada en la misma región (ORF 23/24) es similar a aquella detectada en un aislado de Hainan, China (Tan *et al.*, 2009). Es interesante, que se detectó una delección de ~8 Kb (cepa GVE05) y otra de ~14 Kb (cepa JP), que corresponde a la posición 130 000 pb, con respecto al genoma de referencia (WSSV-CN) y hace referencia a la región WSV234-WSV250, similar a reportes de Li *et al.* (2016).

La naturaleza de las delecciones observadas confirman la relación genética entre los aislados mexicanos y asiáticos, aunque las largas delecciones encontradas en las cepas GVE05 y JP no habían sido reportadas. Mientras que los virus con genomas largos de ADN de doble cadena típicamente exhiben bajos niveles de variación genética (Depledge *et al.*, 2011), WSSV parece poseer regiones genómicas que son redundantes en términos de replicación viral y virulencia. Sin embargo, hasta que sean caracterizados más genomas completos de WSSV que difieran en factores como virulencia, hospedero y grado de replicación, continuará la especulación relacionada al rol que poseen las regiones más variables del genoma en aquellos procesos biológicos (Chai *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016; Ramos-Paredes *et al.*, 2012).

Después de ensamblar y analizar los genomas alineados a los genomas de referencia, se encontró que ciertas regiones difieren entre sitios y son altamente variables. Se encontró una región altamente variable en las muestras analizadas que corresponde a ORF118, 119 y 120, que presenta elevado número de SNPs en los genomas

analizados y ha sido categorizada por Marks *et al.* (2006) dentro del grupo de genes de expresión tardía. Van Hulten *et al.* (2001) identificó regiones con repeticiones en el análisis del genoma WSSV-TH que fueron identificadas como áreas homologas (hr). Una de ellas, (hr69 está localizada junto a ORF120. La variabilidad en ORF 188-120 sugiere que pudieran encontrarse SNPs a tomar en cuenta para estudios posteriores de mapas genéticos, genotipificación y análisis poblacionales (Sauvage *et al.*, 2007). Diferencias en virulencia pueden estar relacionadas a polimorfismos en el genoma ya que los SNPs pueden dar lugar a cambios en los aminoácidos de proteínas con funciones aún desconocidas, putativamente algunas de estas proteínas pueden causar las diferencias en virulencia.

Se analizaron ciertas regiones del genoma que difieren entre sitios, Ramos-Paredes *et al.* (2012) mencionan que al analizar las secuencias correspondientes a ORF 78-80 se observaron inversiones, deleciones e inserciones en muestras de 2000-2005 de Sonora y Sinaloa contrastando con los resultados encontrados en este estudio donde se encontró 100% de similitud en las secuencias de las mismas proteínas al anotar contra la referencia. Ello es evidencia de las variaciones que presentan los genomas virales en cada región ya que las muestras analizadas corresponden a sitios y años diferentes.

Varios autores ya han analizado el número de repeticiones de ORF94 considerada altamente variable y algunos lo asocian con virulencia aunque continua siendo una asociación complicada debido al elevado número de patrones de unidades de repetición que presenta (Dieu *et al.*, 2004; Duran-Avelar *et al.*, 2015; Hoa *et al.*, 2011; Marks *et al.*, 2004; Marks *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2010; Pradeep *et al.*, 2009; Walker *et al.*, 2011). Otro de los marcadores comúnmente analizados en trabajos de genotipificación es ORF75 (1323 nt), en los genomas analizados de México, se encontró que ha sufrido una reducción al comparar con WSSV-TH debido a que es una región altamente variable (Duran-Avelar *et al.*, 2015; Muller *et al.*, 2010) presentando solamente 21.66% de similitud, esta región corresponde a wsv127, 128 y 129 al anotar contra el genoma WSSV-CN y presenta porcentajes de similitud muy bajos (20-30%) lo que sugiere eventos de deleción y fusión

de proteínas, resultados similares a los reportados por Chai *et al.*, (2013) en WSSV de Corea.

Entre otros de los ORFs que han reducido su tamaño, se encontró que ORF167, correspondiente a wsv360 de WSSV-CN ha perdido más de la mitad de la secuencia que se encuentra identificada para WSSV-TH (18222 nt) y WSSV-CN (18234 nt). En todas las cepas analizadas se encontró una reducción de más del 50 % llegando a medir 7430 nt. Algunos autores mencionan que una reducción en el tamaño del genoma puede otorgar una ventaja replicativa (Krell, 1996; Marks *et al.*, 2005) y hacer más eficiente la dispersión y propagación de la enfermedad. Las deleciones identificadas en las cepas del presente estudio fueron incluso mayores en este análisis lo que sugiere que existen recombinaciones intrínsecas que se han establecido para la región.

Los cambios genéticos que dan lugar a nuevas variantes a través de eventos de microevolución han sido observados en varios virus de ADN, hepatitis B, virus de la fiebre porcina africana y herpesvirus I de Ostreidos (Agoti *et al.*, Batista *et al.*, 2015; De Villiers *et al.*, 2010; Stuyver *et al.*, 2000), por mencionar algunos. En el caso de WSSV, pudiera ser que los nuevos arreglos y deleciones reportadas previamente, así como las que se encontraron en el presente trabajo, pueden ser parte de un proceso evolutivo que responde a presión de selección derivada de la producción extensiva en camaronicultura a nivel mundial.

Análisis filogenético

El análisis filogenético confirmó que los genomas de WSSV aislados en México están relacionados con los genomas de otros países, mientras que también revelan la rápida aparición de nuevas variantes. Desde hace tiempo, se ha asumido que la alta movilización internacional de organismos es la responsable de la transferencia de patógenos de Asia hacia América (Lightner, 2011). WSSV-CN y WSSV-TW han sido propuestos como las cepas ancestrales de WSSV (Dieu *et al.*, 2004; Pradeep *et al.*, 2008), y el análisis filogenético realizado lo confirma. Seis de las cepas secuenciadas están

cercanamente relacionadas a WSSV-CN y WSSV-KR, mientras que las demás están más relacionadas a WSSV-TW. Estos resultados sugieren que WSSV fue introducido a México desde los países asiáticos a través de múltiples eventos, además también se confirma que WSSV-MX08 aislado de Sonora esta cercanamente relacionado a WSSV-TH.

La alta variación genómica en las cepas de WSSV analizadas pudiera también asociarse a la co-circulación de múltiples genotipos, aunque es importante notar que WSSV tiene un amplio rango de hospederos y se han reportado más de 93 especies de artrópodos (Sánchez-Paz, 2010). Esas especies de hospederos constituyen una fuente de infección potencial que puede proveer de ventajas en eventos de recombinación y además incrementar la variación genómica de WSSV.

Cultivo primario de hemocitos y reto viral

El sistema inmune de camarones está basado en una variedad de mecanismos que reconocen y clarifican rápida y eficientemente moléculas tóxicas y extrañas que causan enfermedades. Enfermedad es definido como el resultado de interacciones complejas entre hospedero, patógeno y ambiente, pero la aparición de la enfermedad es determinada en mayor medida por la virulencia del patógeno y el sistema de defensa inmune del hospedero en contra de agentes invasores (Casadevall y Pirofsky, 1999).

El cultivo primario de hemocitos es un método simple para estudiar los mecanismos asociados con las interacciones hospedero-virus (Dantas-Lima *et al.*, 2012); en este sentido, el utilizar un cultivo primario de hemocitos de *L. vannamei* como un modelo *in vitro* para estudiar la expresión de genes relacionados al sistema inmune y de genes de WSSV, es una estrategia que puede ser replicable y utilizada para delinear los mecanismos de infección del virus utilizando menor número de organismos y mayor número de replicas bajo condiciones controladas.

La patogénesis de la infección con WSSV es complicada debido a la variedad genética que existe entre cepas (Gao *et al.*, 2014; Marks *et al.*, 2005). En este trabajo se identificaron diferencias en la expresión de moléculas efectoras del sistema inmune de

camarón diferencialmente moduladas por cinco cepas de WSSV, las cuales mostraron diferencias en virulencia (JP y LG como las cepas más virulentas, GVE05 y DVI de virulencia moderada y la cepa LC10 de baja virulencia) además con diferente tamaño de genoma (257-290 Kb de tamaño total) en un cultivo *in vitro* de hemocitos.

Respuesta de genes del sistema inmune

El rol de la fagocitosis en controlar el desarrollo de la infección ha sido estudiado y los niveles de expresión del gen de la proteína activadora de fagocitosis (PAP) ha sido utilizado como un indicador de la activación de la respuesta inmune (Deachamag *et al.*, 2006). Particularmente en este estudio, se encontró que la expresión de PAP tuvo los valores más elevados a 1 hpi y 3 hpi. Estos resultados son diferentes de los reportados en un estudio previo de Deachamag *et al.* (2006) en el cual se retaron camarones con WSSV inactivado, detectando la activación de PAP hasta las 6 horas post-estimulación en la hemolinfa. La expresión elevada de genes relacionados al sistema inmune a 1 hpi y 3 hpi observados en este estudio puede deberse a la rápida respuesta de las células ya que el extracto de WSSV fue introducido directamente dando como resultado una rápida infección. Las cepas JP y LC10 indujeron los mayores niveles de expresión de PAP en el inicio de la infección y aparentemente no hubo relación entre el tamaño del genoma o la virulencia de las cepas.

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) pueden funcionar de dos maneras, pueden encargarse de destruir patógenos pero a su vez, también pueden dañar al hospedero (Yu *et al.*, 1994). Particularmente en la infección con WSSV, ya se ha reportado la inducción de estrés oxidativo en el hospedero debido a la liberación de EROs (Mohankumar y Ramasamy, 2006). SOD es la primera línea de defensa en contra de las EROs para eliminar posible daño oxidativo y es esencial para reducir el estrés oxidante causado por radicales libres. Elevados niveles de expresión de MnSOD indican que existe una elevada oportunidad de enfrentarse al estrés oxidativo. Los datos obtenidos de este estudio indican una respuesta rápida de MnSOD detectada desde 1 hpi con un posterior

decremento. Consistente con este estudio, en un estudio previo se encontró que los niveles de actividad de MnSOD fueron significativamente más altos a 1 hpi que a 24 hpi (Parrilla-Taylor *et al.*, 2013).

Las peroxiredoxinas son una familia de enzimas antioxidantes que se encargan de catalizar la reducción de peróxidos. En este caso, se remueve el peróxido de hidrogeno para reducir el estrés oxidativo y para proteger la inactivación de múltiples enzimas celulares que están relacionadas cercanamente a la generación y eliminación de EROs durante la fagocitosis (Le Moullac *et al.*, 1998; Rhee *et al.*, 2005; Zhen *et al.*, 2015); el peróxido de hidrogeno es en mayor medida producido por MnSOD, y como consecuencia, ambos pueden funcionar como sistema de ataque microbida en contra de microorganismos invasores (Sritunyalucksana *et al.*, 2001). El incremento significativo de la expresión de PRX a 3 hpi puede deberse al incremento de ROS producido durante la infección que debe ser secuestrado por PRX extra traducido a partir de más transcritos de PRX. Estos resultados fueron consistentes con los niveles de expresión de PAP, en donde se observaron los mayores niveles a 3 hpi, induciendo explosión respiratoria. En general, los niveles de expresión de los genes relacionados al sistema inmune analizados decrecieron después de las primeras horas post-infección.

En la cepa LG, los niveles de expresión de MnSOD y PRX fueron significativamente altos a 1 hpi y 3 hpi, respectivamente, sugiriendo una respuesta aguda para evitar el daño celular y estrés oxidativo debido a la infección. Previamente ha sido sugerido, que el genoma ha sufrido cambios evolutivos que involucran contracción, lo que hace pensar que una cepa de WSSV con el genoma de menor tamaño tendría una tendencia a ser el más virulento y de mayor *fitness* (Pradeep *et al.*, 2009). En este estudio, la cepa de WSSV con el genoma más pequeño (cepa LG, 257 Kb de tamaño de genoma) indujo niveles más elevados de mortalidad en el hospedero sugiriendo mayor adaptación del virus. De acuerdo con los datos de mortalidad recabados en el ensayo de reactivación viral de las cepas de WSSV, las cepas JP y LG fueron las más virulentas ocasionando el 100% de mortalidad a 48 hpi resultados que son opuestos a los que se determinaron para la cepa

DVI, la cual ocasionó menores niveles de mortalidad y el mayor tamaño de genoma obtenido en este estudio. La infección causada por WSSV da lugar a un decremento sustancial en la expresión de enzimas antioxidantes como MnSOD y PRX. Estos resultados pueden ser acompañados por un incremento en otros eventos como la peroxidación de lípidos y proteínas carboniladas, indicando que el incremento en EROS después de retos con WSSV pueden causar daño celular y finalmente la muerte (Parrilla-Taylor *et al.*, 2013; Rameshthangam y Ramasamy, 2006; Zeng *et al.*, 2015).

Respuesta de genes de expresión temprana de WSSV

Los genes de WSSV de respuesta inmediata-temprana codifican para proteínas reguladoras que son críticas para la infección viral, el cambio de ciclo de latencia a lítico, replicación viral y transcripción (Honesty y Roizman, 1974). Se han identificado varios genes IE hasta el momento, entre ellos, el gen IE1 ha sido particularmente estudiado. IE1 es factor de transcripción de unión a ADN y tiene actividad de transactivación, que juega un rol fundamental en promover la replicación viral y la proliferación de la infección con WSSV (Liu *et al.*, 2008). Del grupo de genes IE, uno menos estudiado es WSSV304, el cual contiene un dominio RING y funciona como ligasa a ubiquitina E3, importante para la patogénesis en camarón (Huang *et al.*, 2014). IE1 y WSSV304 están regulados por factores Kruppel-like (KLFs) y su regulación transcripcional es crítica para la replicación de WSSV (Huang *et al.*, 2014).

En este estudio, la expresión de IE1 fue especialmente más elevada a 1 hpi en la mayoría de las cepas analizadas; los elevados niveles de expresión en el inicio de la infección, confirman los mecanismos eficientes que mantiene el virus para su replicación ya que los genes virales IE no requieren de síntesis *de novo* para ser activados (Huang *et al.*, 2014). Genes de expresión inmediata, tk-tmk y rr1 además de IE1, fueron expresados desde las 2 hpi en un cultivo de hemocitos retado con WSSV (Jose *et al.*, 2010).

Las cepas JP y LG indujeron los mayores porcentajes de mortalidad (100% a las 48 hpi) en el bioensayo controlado. En este caso, el aislado con el tamaño de genoma más grande (DVI, 290 Kb de genoma) indujo un nivel de mortalidad moderado que puede ser correlacionado con los bajos niveles de expresión de PAP y una expresión de IE1 y WSSV304 más retardada.

Los resultados no mostraron una relación clara entre tamaño de genoma y virulencia, sin embargo, se ha mostrado que las cepas de WSSV con diferente virulencia pueden afectar el sistema inmune de manera heterogénea (Gao *et al.*, 2014). Los aislados de mayor virulencia pueden estar codificando factores asociados a virulencia que modulan el estado inmune del hospedero y que en aislados menos virulentos están ausentes o han perdido su función.

9. CONCLUSIONES

Se obtuvo el genoma de nueve cepas de WSSV en México las cuales presentaron variaciones nucleotídicas que lo distinguieron filogeográficamente del resto de genomas identificados en Asia. A nivel regional, los resultados de este trabajo permitieron la identificación de variantes genéticas más virulentas o de rápida dispersión que además tienen un impacto negativo sobre la producción de camarón a nivel nacional. Las variaciones genéticas particulares observadas entre las cepas analizadas no mostraron un patrón que pudiera asociarse a diferencias en la virulencia.

La captura de genomas por medio de amplificación de segmentos de aproximadamente 20 Kb generados en este estudio cubrieron el genoma completo de WSSV en segmentos que sobrelapan. Esta metodología representa una optimización de la información generada por un chip 314 de Ion Torrent con muestras marcadas con código de barras, hace posible generar los datos en tiempo y costo eficiente. Este estudio también provee de una visión sobre los beneficios del análisis de genomas de WSSV completos en comparación la aproximación actual de genotipificar WSSV basándose en la secuenciación de las regiones variables ORF75, ORF94 y ORF125. Los datos revelaron las diferencias de las cepas mexicanas de WSSV y su procedencia de al menos dos ancestros. La incorporación de nueve nuevos genomas con diferencias importantes contribuirán a nuevos estudios en evolución de genomas a corto plazo y a avanzar al conocimiento sobre los procesos de patogénesis de WSSV.

A partir de los ensayos *in vitro* donde se evaluó la respuesta del hospedero y del virus, los resultados no apoyan la hipótesis previa propuesta de que el encogimiento del genoma de WSSV es un proceso adaptativo que puede otorgar ventajas de replicación al virus y contribuir a incrementar la virulencia y el fitness. La patogénesis de cepas virales de WSSV no ha sido completamente entendida y se requieren futuras investigaciones para identificar mecanismos determinantes de virulencia.

10. LITERATURA CITADA

- Allander, T., S. Emerson, R. Engle, R. Purcell, J. Bukh. 2001. A virus discovery method incorporating DNase treatment and its application to the identification of two bovine parvovirus species. *PNAS*. 98:11609-11614.
- Andrade, A. 2011. Shrimp immunological reactions against WSSV: role of haemocytes on WSSV fate. Thesis (Master of Science in Aquaculture). Gent, Belgica. Universiteit Gent, Faculty of Bioscience Engineering Academic. 60 p.
- Bachère, E., Y. Gueguen, M. Gonzalez, J. de Lorgeril, J. Garnier, B. Romestand. 2004. Insights into the anti- microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol. Rev.* 198:149-168.
- Bai, C., C. Wang, J.Xia, H. Sun, S. Zhang, J. Huang. 2015. Emerging and endemic types of Ostreid herpesvirus 1 were widely detected in bivalves in China. *J. Invert. Patol.* 124:98-106.
- Barzon, L., E. Lavezzo, V. Militello, S. Toppo, G. Palú. 2011. Applications of Next-Generation Sequencing Technologies to Diagnostic Virology. *Int. J. Mol. Sci.* 12:7861-7884.
- Batista, F.M., M. López-Sanmartín, A. Grade, I. Morgado, M. Valente, J.I. Navas, D.M. Power, F. Ruano. 2015. Sequence variation in ostreid herpesvirus 1 microvar isolates detected in dying and asymptomatic *Crassostrea angulata* adults in the Iberian Peninsula: Insights into viral origin and spread. *Aquaculture*. 435:43-51.
- Beerenwinkel, N., H.F. Gunthard, V. Roth, K. J. Metzner. 2012. Challenges and opportunities in estimating viral genetic diversity from next-generation sequencing data. *Front. Microbiol* 3:(329)1-16.
- Casadevall, A., L. A. Pirofski. 1999. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect. Immun.* 67:3703e13.
- Chai, C. Y., J. Yoon, Y. S. Lee, Y. B. Kim, T. J. Choi. 2013. Analysis of the Complete Nucleotide Sequence of a White Spot Syndrome Virus Isolated from Pacific White Shrimp. *J. Microbiol.* 51:695-699.
- Chakraborty, S., U. Ghosh. 2014. White Spot Syndrome Virus (WSSV) in Crustaceans: An Overview of Host-Pathogen Interaction. *J. Mar. Biol. Oceanogr.* 3:1-17.
- Chen, S. N., C. S. Wang. 1999. Establishment of cell lines derived from oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg and hard clam, *Meretrix lusoria* Röding. *Met. Cell. Sci.* 21(4):183-192.
- Chou, H. Y., C. Y. Huang, C. H. Wang, H. C. Chiang, C. F. Lo. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.* 23:165–173.
- Dantas-Lima, J.J., M. Corteel, D. T.H. Oanh, P. Bossier, P. Sorgeloos, H. J. Nauwynck. 2012. Development of two haemocyte culture systems in attachment and in suspension for shrimp immunity studies. *Aquaculture*. 366–367:17–26.

- Deachamag, P., U. Intaraphad, A. Phongdara, W. Chotigeat. 2006. Expression of a phagocytosis activating protein (PAP) gene in immunized black tiger shrimp. *Aquaculture* 255:165–172.
- Depledge, D. P., A. L. Palser, S. J. Watson, I. Y.-C. Lai, E. R. Gray, P. Grant, J. Breuer. 2011. Specific capture and whole-genome sequencing of viruses from clinical samples. *PLoS One*, 6(11).
- De Villiers, E. P., C. Gallardo, M. Arias, M. Da Silva, C. Upton, R. Mantin, Bishop, R. 2010. Phylogenetic analysis of 11 complete African swine fever virus genome sequences. *Virology*. 400:128-136.
- Dieu, B.T.M., H. Marks, J.J. Siebenga, R.W. Goldbach, D. Zuidema, T. P. Duong, J. M. Vlak. 2004. Molecular epidemiology of white spot syndrome virus within Vietnam. *J. Gen. Virol.* 85:3607–3618.
- Domingo, E., R. G. Webster, J. J. Holland. 1999. *Origin and Evolution of Viruses*, Academic Press, San Diego. pp. 1–24.
- Duran-Avelar, M. J., R. Pérez-Enríquez, J. F. Zambrano-Zaragoza, L. Montoya-Rodríguez, R. Vázquez-Juárez, N. Vibanco-Pérez. 2015. Genotyping WSSV isolates from northwestern Mexican shrimp farms affected by white spot disease outbreaks in 2010-2012. *Dis. Aquat. Org.* 114:11-20.
- Einer-Jensen, K. 2004. Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Gen. Virol.* 85(5):1167–1179.
- Eren, A., O. Esen, C. Quince, J. Vineis, H. Morrison, M. Sogin, T. Delmont. 2015. Anvi'o: an advanced analysis and visualization platform for 'omics data. *PeerJ* 3:e1319.
- Escobedo-Bonilla, C.M., L. Audoorn, M. Wille, V. Alday-Sanz, P. Sorgeloos. 2006. Standardized white spot syndrome virus (WSSV) inoculation procedures for intramuscular or oral routes. *Dis. Aquat. Org.* 68:181–188.
- Everett, R.D. 2000. ICP0, a regulator of herpes simplex virus during lytic and latent infection. *BioEssays* 22:761–770.
- Gao, M., F. Li, L. Xu, X. Zhu. 2014. White spot syndrome virus strains of different virulence induce distinct immune response in *Cherax quadricarinatus*. *Fish. Shell. Immunol.* 39(1):17-23.
- Guindon, S., O. Gascuel. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52:696–704
- Hoa, T. T. T., M. P. Zwart, N. T. Phuong, D. T. H. Oanh, M. C. M. de Jong, J. M. Vlak. 2012. Indel-II region deletion sizes in the white spot syndrome virus genome correlate with shrimp disease outbreaks in southern Vietnam. *Dis. Aquat.* 99:153-162.
- Honess, R. W., B. Roizman. 1974. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J. Virol.* 14:8–19.
- Huang, P. H., S. C. Lu, S. H. Yang, P. S. Cai, C. F. Lo, L. K. Chang. 2014. Regulation of the immediate-early genes of white spot syndrome virus by *Litopenaeus vannamei* kruppel-like factor (LvKLF). *Dev. Comp. Immunol.* 46:364-367.

- Jiravanichpaisal, P., B. L. Lee, K. Söderhäll. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*. 211: 213–236.
- Jose, S., A. Mohandas, R. Philip, I. S. Bright Singh. 2010. Primary hemocyte culture of *Penaeus monodon* as an in vitro model for white spot syndrome virus titration, viral and immune related gene expression and cytotoxicity assays. *J. Invertebr. Pathol.* 105: 312–21.
- Kimura, T., K. Yamano, H. Nakano, K. Momoyama, M. Hiraoka. 1996. Detection of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) by PCR. *Fish. Pathol.* 31:93–98.
- Krell, P. J. 1996. Passage effect of virus infection in insect cells. *Cytotechnology*. 20: 125–137.
- Langmead, B., S. Salzberg. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 9:357-359.
- Le Moullac, G., C. Soyeux, D. Saulnier, D. Ansquer, J. Christophe, P. Levy. 1998. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish. Shellf. Immunol.* 8:621-629.
- Leu, J., F. Yang, X. Zhang, X. Xu, G. Kou, C. Lo. 2009. Whispovirus. *Curr Top Microbiol Immunol.* 328:197-227.
- Li, D. F., M. C. Zhang, H. J. Yang, Y. B. Zhu, X. Xu. 2007. [beta]-integrin mediates WSSV infection. *Virology*. 368:122–132.
- Li, F., M. Gao, L. Xu, F. Yang. 2016. Comparative genomic analysis of three white spot syndrome virus isolates of different virulence. *Virus Genes*. 53:249-58.
- Lightner, D. V. 2011. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. *J. Invert. Patol.* 106:110-30.
- Lightner, D., R.Redman, C. R. Pantoja, K. F. J. Tang, B. L. Noble, P. Schofield, L. L. Mohny, L. M. Nunan, S. A. Navarro. 2012. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *J. Invert. Patol.* 110:174-183.
- Lin, F., H.Huang, W. Ke, L. Hou, F. Li, F. Yang. 2013. Characterization of white spot syndrome virus immediate-early gene promoters. *J. Gen. Virol.* 94:387-392.
- Liu, W. J., Y. S. Chang, H. C. Wang, J. H. Leu, G. H. Kou, C. F. Lo. 2008. Transactivation, dimerization, and DNA-binding activity of white spot syndrome virus immediate-early protein IE1. *J. Virol.*, 82:11362–11373.
- Livak, K. J., T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods*. 25:402–408
- López, B., D. Aguilar, H. Orozco, M. Burger, C. Espitia, V. Ritacco. 2003. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin. Exp. Immunol.* 133:30e7.
- López-Félix, S. C. 2002. Determinación y evaluación por PCR de la presencia del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), en unidades de producción camaronícola del estado de Sinaloa. MS dissertation, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Mazatlán, Sinaloa, México. 86 pp.

- Ma, J., L. Zeng, Y. Lu. 2015. Penaeid shrimp cultures and its applications. *Rev. Aqua.* 0: 1-11.
- Marks, H., R. W. Goldbach, J. M. Vlak, M. C. W. Van Hulten. 2004. Genetic variation among isolates of white spot syndrome virus. *Arch. Virol.* 149:673–697.
- Marks, H., J. J. van Duijse, D. Zuidema, M. C. van Hulten, J. M. Vlak. 2005. Fitness and virulence of an ancestral white spot syndrome virus isolate from shrimp. *Vir. Res.* 110:9–20.
- Marks, H., X. Ren, H. Sandbrink, M. van Hulten, J. Vlak, J. 2006. In silico identification of putative promoter motifs of White Spot Syndrome Virus. *BMC. Bioinformatics.* 7:309.
- Martin, M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high throughput sequencing reads. *EMBnet. Journal.* 17:10-12.
- Mendoza-Cano, F., A. Sanchez-Paz. 2013. Development and validation of a quantitative real-time polymerase chain assay for universal detection of the White Spot Syndrome Virus in marine crustaceans. *Virol. Journal.* 10:186.
- Mohankumar, K., P. Ramasamy. 2006. White spot syndrome virus infection decreases the activity of antioxidant enzymes in *Fenneropenaeus indicus*. *Virus. Res.* 115: 69e75.
- Muller, I.C., T. P. D. Andrade, K. F. J. Tang-Nelson, M. R.F. Marques, D. V. Lightner. 2010. Genotyping of white spot syndrome virus (WSSV) geographical isolates from Brazil and comparison to other isolates from the Americas. *Dis. Aquat. Org.* 88:91-98.
- Ng, T. F. F., S. Alavandi, A. Varsani, S. Burghart, M. Breitbart. 2013. Metagenomic identification of a nodavirus and a circular ssDNA virus in semi-purified viral nucleic acids from the hepatopancreas of healthy *farfantepenaeus duorarum* shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 105:237-242.
- Nunan, L., B. T. Poulos, D. V. Lightner. 1998. The detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) and Yellow Head Virus (YHV) in imported commodity shrimp. *Aquaculture.* 160:19-30.
- Parrilla-Taylor, D. P., T. Zenteno-Savin, F. Magallon-Barajas. 2013. Antioxidant enzyme activity in pacific whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to infection with white spot syndrome virus. *Aquaculture.* 380-383:41-46.
- Pop, M., A. Phillippy, A. L. Delcher, S. L. Salzberg. 2004. Comparative genome assembly. *Brief. Bioinform.* 5:237–48.
- Pradeep, B., M. Shekar, N. Gudkovs, I. Karunasagar, I. Karunasagar. 2008. Genotyping of white spot syndrome virus prevalent in shrimp farms of India. *Dis. Aquat. Org.* 78:189–98.
- Pradeep, B., Karunasagar, I., I. Karunasagar. 2009. Fitness and virulence of different strains of white spot syndrome virus. *J. Fish. Dis.* 32:801–5.
- Radford, A. D., D. Chapman, L. Dixon, J. Chantrey, L. Darby, N. Hall. 2012. Application of next-generation sequencing technologies in virology. *J. Gen. Virol.* 93:1853-1868.
- Rameshthangam, P., P. Ramasamy. 2006. Antioxidant and membrane bound enzymes activity in WSSV-infected *Penaeus monodon Fabricius*. *Aquaculture.* 254:32–39.

- Ramos-Paredes, J., J. M. Grijalva-Chon, J. D. Rosa-Vélez, L. M. Enríquez-Paredes. 2012. New genetic recombination in hypervariable regions of the white spot syndrome virus isolated from *Litopenaeus vannamei* (Boone) in northwest Mexico. *Aquac. Res.*, 43(3):339–348.
- Rhee, E. S.G., H. Z. Chae, K. Kim. 2005. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Rad. Biol. Med.* 38:1543-1552.
- Reed, L.J., H. Muench. 1938. A simple method of estimating fifty per cent end points. *Am. J. Hyg.* 27:493-497.
- Reno, P. W. 1998. Factors involved in the dissemination of disease in fish populations. *J. aquat. Anim. Health.* 10:160-171.
- Rinkevich, B. 1999. Cell cultures from marine invertebrates: obstacles, new approaches and recent improvements. *J. Biotech.* 70: 133–173.
- Rodríguez-Anaya L., J. González-Galavis J, D. Casillas-Hernández, F. Lares-Villa, K. Estrada, J. C. Ibarra-Gámez, F. Sánchez-Flores. 2016. Draft Genome Sequence of White Spot Syndrome Virus Isolated from Cultured *Litopenaeus vannamei* in Mexico. *Genome Announc.* 4:4-5.
- Rosenberry, B. 2000. World Shrimp Farming. *Shrimp News International*, San Diego, California, USA, 324 pp. 356-361.
- Sablok, G., A. Sánchez-Paz, X. Wu, J. Ranjan, J. Kuo, I. Bulla. 2012. Genome dynamics in three different geographical isolates of white spot syndrome virus (WSSV). *Arch. Virol.* 157(12):2357–62.
- Sánchez-Paz A. 2010. White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. *Vet. Res.* 41:43.
- Sauvage, C., N. Bierne, P. Boudry. 2007. Single nucleotide polymorphisms and their relationship to codon usage bias in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Gene.* 406:13-22.
- Shekar, M., B. Pradeep. 2012. White spot syndrome virus: Genotypes, epidemiology and evolutionary studies. *Indian. J. Virol.* 23(2):175–183.
- Schmieder, R., R. Edwards. 2011 Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics.* 27:863-4.
- Shi, Z., H. Wang, J. Zhang, Y. Xie, L. Li, X. Chen. 2005. Response of crayfish, *Procambarus clarkii*, haemocytes infected by white spot syndrome virus. *J. Fish. Dis.* 28:151–156.
- Sindhupriya, M., P. Saravanan, S. K. Otta, C. Amarnath, R. Arulraj, T. Bhuvaneshwari, P. Praveena, K. P. Jithendran, A. G. Ponniah. 2014. White spot syndrome virus (WSSV) genome stability maintained over six passages through three different penaeid shrimp species. *Dis. Aquat. Org.* 111:23–29.
- Sritunyalucksana, K., K. Wongsuebsantati, M. W. Johansson, K. Soderhall. 2001. Peroxinectin, a cell adhesive protein associated with the proPO system from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 25:353-363.

- Stuyver, L., S. De Gendt, C. Van Geyt, F. Zoulim, M. Fried, R. Schinazi, E. Rossau. 2000. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J. Gen. Virol.* 81:67-74.
- Sud, D., D. Doumec, E. López, C. Milet. 2001. Role of water-soluble matrix fraction, extracted from the nacre of *Pinctada maxima*, in the regulation of cell activity in abalone mantle cell culture (*Haliotis tuberculata*). *Tiss. Cell.* 33(2):154-160.
- Suttle, C. A. 2005. Viruses in the Sea. *Nature.* 437: 356-361
- Tan, Y., Z. Shi. 2011. Genotyping of white spot syndrome virus in Chinese cultured shrimp during 1998–1999. *Virol Sin.* 26:123–30.
- Tcherepanov, V., A. Ehlers, C. Upton. 2006. Genome Annotation Transfer Utility (GATU): rapid annotation of viral genomes using a closely related reference genome. *BMC. Genom.* 7:150.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, D. G. Higgins. 2002. Multiple Sequence Alignment Using Clustal W and Clustal X. *Curr. Protoc. Bioinformatics.* 2.3.1–2.3.22.
- Tsai, M.F., H.T. Yu, H. F. Tzeng, J. H. Leu, C. M. Chou, C. J. Huang, C. H. Wang, J. Y. Lin, G. H. Kou, C. F. Lo. 2000. Identification and characterization of a shrimp white spot syndrome virus (WSSV) gene that encodes a novel chimeric polypeptide of cellular-type thymidine kinase and thymidylate kinase. *Virol.* 277:100–110.
- Troyer, R. M., G. Kurath. 2003. Molecular epidemiology of infectious hematopoietic necrosis virus reveals complex virus raffic and evolution within southern Idaho aquaculture. *Dis. Aquat. Org.* 55:175-185.
- Uribe-Convers, S., J. R. Duke, M. J. Moorre, D. C. Tank. 2014. A Long PCR-Based Approach for DNA Enrichment Prior to Next-Generation Sequencing for Systematic Studies. *Applic. Plant. Sciences.* 2:1300063.
- Van Hulst, M.C.W., J. Witteveldt, S. Peters, N. Kloosterboer, R. Tarchini, M. Fiers, H. Sandbrink, R. K. Lankhorst, J. M. Vlak. 2001. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology* 286, 7–22.
- Vignuzzi, M., J. K. Stone, J. J. Arnold, C. E. Cameron, R. Andino. 2006. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative inter- actions in a viral population. *Nature* 439:344–348
- Waikhom, G., K. R. John, M. R. George, M. J. P. Jeyaseelan. 2006. Differential hosts passaging alters pathogenicity and induces genomic variation in white spot syndrome virus. *Aquaculture.* 261: 54–63.
- Wang, C.H., C. F. Lo, J. H. Leu, C. M. Chou, P. Y. Yeh, 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.
- Watthanasurorot, A., P. Jiravanichpaisal, I. Soderhall, K. Soderhall. 2010. A gC1qR Prevents White Spot Syndrome Virus Replication in the Freshwater Crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J. virol.* 10844-10851.
- Wilhelm, S.W., C. Suttle. 1999. Viruses and nutrient cycles in the sea – viruses play critical roles in the structure and function of aquatic food webs. *BioScience.* 49(10):781-788.

- Winton, J. R. 1992. Evolution of fish rhabdoviruses. OJI International Symposium on Salmonid Diseases Hokkaido University Press. 88-95.
- Wongteerasupaya, C., J. E. Vickers, S. Sriurairatana, G. L. Nash, A. Akarajamorn, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassankajon, B. Withyanchumnarnkul, T. W. Flegel. 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in black tiger prawn *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Org. 21:69–77.
- Xie, X., H. Li, F. Yang. 2005. A simple and efficient method for purification of intact white spot syndrome virus (WSSV) viral particles. Vir. Res. 108:63-67.
- Yang, F., J. He, X. H. Lin, Q. Li, D. Pan, X. B. Zhang, X. Xu. 2001. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. J. Virol. 75:11811–11820.
- Yu, B.P. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Physiol. Rev. 74:139.
- Zhen, Y., C. Lu. 2009. Identification of differentially expressed genes in haemocytes of the crayfish (*Procambarus clarkii*) infected with white spot syndrome virus by suppression subtractive hybridization and cDNA microarrays. Fish and Shellfish Immunology. 26:646-650.
- Zheng, D., M. Peng, X. Chen, C. Yang, X. Chen, X. Li, Y. Zhao. 2015. Molecular cloning, characterization, and immune response against white spot syndrome virus and taura syndrome virus infections of peroxiredoxin in *L. vannamei* and its antioxidant activity. Crustaceana. 88:1149-1161.
- Zwart, M. P., B. T. M. Dieu, L. Hemerik, J.M. Vlak. 2010. Evolutionary Trajectory of White Spot Syndrome Virus (WSSV) Genome Shrinkage during Spread in Asia. PLoS ONE 5 (10): e13400

11. ANEXOS

Anexo A. Datos de origen y de genotipificación de los aislados de WSSV utilizados.

NAYARIT 2011

Zona	Granja	MUESTRA	VARIANTE ORF 94	VARIANTE ORF 75	VARIANTE ORF 125	MORTALIDAD %
Norte	Acuicola Cuquis	AC.1	5,1 [T,T,G,T,T]	-	9,1 [V,I(5)]	97.5
Centro	Juan Pardo	J.P.	12,1 [T,T,T,T,T,G,T,T, T,G,G,T]	11A [α - β -3 α - β -2 α - β -2 α]	-	90

NAYARIT 2012

Sur	Gloria SA de CV	LG	3,1 [G,T,T]	7 [α - β -2 α - β -2 α /T138]	11 [V, VI(4), IX, VIII, IV]	75.5
-----	-----------------	----	-------------	---	-----------------------------	------

SINALOA 2011

JUNTA LOCAL	GRANJA	MUESTRA	VARIANTE ORF 94	VARIANTE ORF 75	VARIANTE ORF 125	MORTALIDAD %
Angostura	La Cuchilla	LC.1	3,1 [G,T,T]	7 [α - β -2 α - β -2 α /T138]	12 [VI(6), IX, IV(2)]	6
Angostura	La Cuchilla	LC.10	3,1 [G,T,T]	7 [α - β -2 α - β -2 α /T138]	11 [VI(6), IX, IV]	6
El Dorado	Dunaliella Sc VI	D.VI	3,1 [G,T,T]	6 [β -2 α - β -2 α /A138]	12 [VI(6), IX, VIII, IV]	58.7

SINALOA 2012

Guasave	Ac. Frecarcon	ACF.2	3,1 [G,T,T]	7 [α - β -2 α - β -2 α /A138]	11 [VI(6), VIII, IV]	70
Guasave	Ac. Frecarcon	ACF.4	3,1 [G,T,T]	7 [α - β -2 α - β -2 α /T138]	9 [VI(4), VIII, IV]	70

Anexo B. Información de los oligos diseñados para para captura de ADN de WSSV.

	Oligos sentido	
1	seq1_147_F	TGTA AACGACGGCCAGTAACGGTTTATGGCGCAGAGA
2	seq2_4_F	TGTA AACGACGGCCAGTACCTCCGTACCCTTCTCTGT
3	seq3_421_F	TGTA AACGACGGCCAGTGACGTGTCCCTTACCCTTCC
4	seq4_346_F	TGTA AACGACGGCCAGTAGCCAAAACACCGTCCA ACT
5	seq5_587_F	TGTA AACGACGGCCAGTACCAGACGCGTAGTTGTTGT
6	seq6_361_F	TGTA AACGACGGCCAGTTCGACTGTGCTCTACCCAGA
7	seq7_364_F	TGTA AACGACGGCCAGTAGTTGCTCCTGGTGTGCTC
8	seq8_144_F	TGTA AACGACGGCCAGTATTCCTCCTCCACCTCCTCC
9	seq9_192_F	TGTA AACGACGGCCAGTTGTGGTCGAATCTGACAGGC
10	seq10_431_F	TGTA AACGACGGCCAGTACGCCTTAAACTCTTCGCCA
11	seq11_557_F	TGTA AACGACGGCCAGTCTCATCCGTGCGAGGTAAA
12	seq12_180_F	TGTA AACGACGGCCAGTCTCCCATGTCCACAAGTGCT
13	seq13_152_F	TGTA AACGACGGCCAGTCTCCCGTTCTCTTGACAC
14	seq14_29_F	TGTA AACGACGGCCAGTTGTCCCCTGTGAGCTCTCTT
15	seq15_368_F	TGTA AACGACGGCCAGTGGGCATAGAAGAGCTCCGTG
16	seq16_177_F	TGTA AACGACGGCCAGTGGCGGCGATCCTTCTTTGTA
17	seq17_31_F	TGTA AACGACGGCCAGTACGAGGCCATGAATTCAGCA
18	seq18_20_F	TGTA AACGACGGCCAGTTTCGCTCTGTACGTGGTTCC
19	seq19_246_F	TGTA AACGACGGCCAGTACTCCTCCCTTACCTCCTC
20	seq20_414_F	TGTA AACGACGGCCAGTGTTCCTCCGCTGCAGTTTCG
21	seq21_114_F	TGTA AACGACGGCCAGTCTGCCGCCAAAATCGACATT
22	seq22_209_F	TGTA AACGACGGCCAGTGAAAGTTAACGCCGCCAAG
23	seq23_241_F	TGTA AACGACGGCCAGTTGGTCACCGTGTCTAAGTGC
24	seq24_513_F	TGTA AACGACGGCCAGTCTGCAAAAGACA ACTGGGGC
25	seq25_19_F	TGTA AACGACGGCCAGTCAATCGGTGAACATGGCGTC
26	seq26_227_F	TGTA AACGACGGCCAGTTCCTCAGAACGAGCCAACC
27	seq27_173_F	TGTA AACGACGGCCAGTACGGATTGGGAGATGGCAAA
28	seq28_242_F	TGTA AACGACGGCCAGTCTTCTGGCAGACTCAGACG
29	seq29_395_F	TGTA AACGACGGCCAGTGGATGCGAAATTTGCCTGCA
30	seq30_165_F	TGTA AACGACGGCCAGTCCAATCTGGGCCTACGTTCA
31	seq31_41_F	TGTA AACGACGGCCAGTGACCAACATCCCGTCTCCAG
	Oligos antisentido	
1	seq1_815_R	CTTGGAGACGGAGACCACAC
2	seq2_560_R	ACAATCTTCTCCACGCGAG
3	seq3_892_R	ACGTGTCAGTAAAGGCTCGG
4	seq4_856_R	TGAAGCAGCTCCACGATACC

5	seq5_901_R	TTCAGTCTCCGCTCCAAACC
6	seq6_904_R	ACGTCATCAGTATCACCGGC
7	seq7_737_R	ACTATGGGGCAAGAGGGTCT
8	seq8_665_R	GGCTGCTAGTTCTCGACGTT
9	seq9_849_R	AGCCATCTGATGTGCCACAA
10	seq10_800_R	GGACTCGGCATCCACTTTCA
11	seq11_875_R	TCTGTGCACTGTGAACGTGT
12	seq12_563_R	AATCTTGCGCACCTACAGCT
13	seq13_591_R	GAGGAAGTACGTGCCCAACA
14	seq14_831_R	ACACTTTGTCCGCTGTCAGT
15	seq15_885_R	GCGACGAAGGAGCAGTAGTA
16	seq16_608_R	TGGATTGCGACTCTCCCCTA
17	seq17_632_R	TTTGGGGCCAGTCATATCCG
18	seq18_436_R	TCGAGAGGGTAGGTTCTGGG
29	seq19_874_R	GGGAAGGTTTGGTGTAGCA
20	seq20_913_R	GCCTTTCAGCGATGTCTCCT
21	seq21_609_R	CTACAGCCCTTCATGCGCTA
22	seq22_648_R	ACGCCTGCTATTGTGTCGAA
23	seq23_947_R	AGCCTCGATACGGCTCTTTG
24	seq24_822_R	CCGCCTCTTGAACCACAT
25	seq25_570_R	CTGCTTGCATCCGTTTCTGG
26	seq26_858_R	CGGAATGGAGAAACGGACCA
27	seq27_764_R	TCCGCTGCAATGGATGATGA
28	seq28_949_R	CGTACACTGGGCCAAGATGT
29	seq29_719_R	TTCGGACGAGCATCTTCTGG
30	seq30_881_R	GTCCTTCAAATGCGGCCGTT
31	seq31_606_R	TGCCAGTGGAGGTTGTTGTT

Anexo C. Información del tamaño esperado de las amplificaciones cortas y largas para captura de ADN de WSSV.

Amplificaciones cortas			
	Posición oligo F	Posición oligo R	Tamaño esperado pb
Seq1_F+Seq1_R	147	815	668
Seq2_F+Seq2_R	4	560	556
Seq3_F+Seq3_R	421	892	471
Seq4_F+Seq4_R	346	856	510
Seq5_F+Seq5_R	587	901	314
Seq6_F+Seq6_R	361	904	543
Seq7_F+Seq7_R	364	737	373
Seq8_F+Seq8_R	144	665	521
Seq9_F+Seq9_R	192	849	657
Seq10_F+Seq10_R	431	800	369
Seq11_F+Seq11_R	557	875	318
Seq12_F+Seq12_R	180	563	383
Seq13_F+Seq13_R	152	591	439
Seq14_F+Seq14_R	29	831	802
Seq15_F+Seq15_R	368	885	517
Seq16_F+Seq16_R	177	608	431
Seq17_F+Seq17_R	31	632	601
Seq18_F+Seq18_R	20	436	416
Seq19_F+Seq19_R	246	874	628
Seq20_F+Seq20_R	414	913	499
Seq21_F+Seq21_R	144	609	465
Seq22_F+Seq22_R	209	648	439
Seq23_F+Seq23_R	241	947	706
Seq24_F+Seq24_R	513	822	309
Seq25_F+Seq25_R	19	570	551
Seq26_F+Seq26_R	227	858	631
Seq27_F+Seq27_R	173	764	591
Seq28_F+Seq28_R	242	949	707
Seq29_F+Seq29_R	395	719	324
Seq30_F+Seq30_R	165	881	716
Seq31_F+Seq31_R	41	606	565
			20,000- SeqF+SeqR
Amplificaciones largas			
Seq1_F+Seq3_R	147	892	20745
Seq3_F+Seq5_R	421	901	20480

Seq5_F+Seq7_R	587	737	20150
Seq7_F+Seq9_R	364	849	20485
Seq9_F+Seq11_R	192	875	20683
Seq11_F+Seq13_R	557	591	20034
Seq13_F+Seq15_R	152	885	20733
Seq15_F+Seq17_R	368	632	20264
Seq17_F+Seq19_R	31	874	20843
Seq19_F+Seq21_R	246	609	20363
Seq21_F+Seq23_R	114	947	20833
Seq23_F+Seq25_R	241	570	20329
Seq25_F+Seq27_R	19	858	20839
Seq27_F+Seq29_R	173	949	20776
Seq29_F+Seq1_R	395	815	20937