



Revista de Biología Marina y Oceanografía

ISSN: 0717-3326

revbiolmar@gmail.com

Universidad de Valparaíso

Chile

Bustillo-Ruiz, Martin I.; Escobedo-Bonilla, César M.; Sotelo-Mundo, Rogerio R.
Revisión de patogénesis y estrategias moleculares contra el virus del síndrome de la mancha blanca
en camarones peneidos
Revista de Biología Marina y Oceanografía, vol. 44, núm. 1, abril, 2009, pp. 1-11
Universidad de Valparaíso
Viña del Mar, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=47911450001>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Revisión de patogénesis y estrategias moleculares contra el virus del síndrome de la mancha blanca en camarones peneidos

A review of pathogenesis and molecular strategies against white spot syndrome virus of penaeid shrimp

Martin I. Bustillo-Ruiz¹, César M. Escobedo-Bonilla^{2,3} and Rogerio R. Sotelo-Mundo¹

¹Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera a Ejido La Victoria Km 0.6, Hermosillo, Sonora, 83000 México

²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Unidad Hermosillo. Centenario Norte #53, Col. Centenario, Hermosillo Sonora, 83160 México

³Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Sinaloa. Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes #250, Col. San Joachin, Guasave, Sinaloa, 81101 México
rrs@ciad.mx

Abstract. White spot syndrome virus (WSSV) causes high mortality to farmed shrimp and serious economic losses. Its unique sequence and genome structure has placed WSSV in its own new family Nimaviridae. Recently, high performance molecular techniques have made it possible to identify and characterize several WSSV structural proteins. These include 'shotgun' sequencing and isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ). Such techniques have made it possible to characterize 14 new WSSV proteins. Location and characterization of structural proteins can help to understand WSSV morphogenesis and pathogenesis. Both processes are essential to understand the mechanism of infection and to develop novel control methods. At present no effective treatments exist to fight WSSV in the field. WSSV structural proteins such as VP28 and VP19 have been evaluated to reduce the impact of WSSV. These molecules are essential early in the infection. Neutralization assays using specific antibodies against WSSV structural proteins have shown an increased survival of treated shrimp. Recently, RNA interference (RNAi) constructs directed against structural proteins have been used as a new tool to reduce/inhibit WSSV replication. A better comprehension of the host-pathogen interaction would allow the development of new methods to control WSSV. The use of high throughput techniques to determine the location and function of structural proteins will contribute to develop new strategies against infection. Intervention strategies aimed to block virus entry into the host cells may be a valuable output from these studies.

Key words: WSSV, structural proteins, shotgun sequencing, iTRAQ, infection mechanism, control methods

Resumen. El virus del síndrome de mancha blanca (WSSV) provoca graves mortandades en granjas de cultivo de camarones peneidos y serias pérdidas económicas. La secuencia y estructura genética excepcionales de WSSV lo colocan en su propia nueva familia, Nimaviridae. Recientemente, novedosas técnicas moleculares de alto rendimiento han permitido identificar y caracterizar varias proteínas estructurales de WSSV. Estas incluyen la secuenciación por 'shotgun' y marcadores isobáricos para cuantificación absoluta y relativa (iTRAQ). Dichas técnicas han permitido caracterizar 14 nuevas proteínas de WSSV. La caracterización y localización de proteínas estructurales pueden ayudar a conocer la morfogénesis y patogénesis de WSSV. Ambos procesos son esenciales para entender el mecanismo de infección y para desarrollar nuevos métodos de control. Hasta ahora no existen tratamientos efectivos para combatir este virus en campo. Proteínas estructurales de WSSV como VP28 y VP19 han sido evaluadas para reducir el impacto de WSSV. Estas moléculas son esenciales en las etapas tempranas de infección. Bioensayos de neutralización usando anticuerpos específicos contra proteínas estructurales de WSSV han aumentado la supervivencia de camarones tratados. Recientemente, construcciones de RNA de interferencia (RNAi) dirigidos contra proteínas estructurales han sido usadas como una nueva herramienta para reducir/inhibir la replicación de WSSV. Una mejor comprensión de las interacciones hospedero-patógeno permitirá desarrollar nuevos métodos para controlar este virus. La localización y función de proteínas estructurales usando métodos de alto rendimiento contribuirá a implementar nuevas estrategias contra la infección. Métodos de intervención para bloquear la entrada del virus a la célula podrían ser valiosos productos de este tipo de investigaciones.

Palabras clave: WSSV, proteínas estructurales, secuenciación 'shotgun', iTRAQ, mecanismo de infección, métodos de control

Introducción

El virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV, 'white spot syndrome virus' por sus siglas en inglés) es uno de los patógenos más devastadores para el cultivo del camarón (Inouye *et al.* 1994, Rosenberry 2001). Este virus afecta a una gran variedad de crustáceos y debido a su alta patogenicidad en camarones peneidos representa un peligro a la camaronicultura al causar un alto impacto económico (Chou *et al.* 1995). Desde su aparición en 1992 en Taiwán (Chou *et al.* 1995) hasta el año 2003, las pérdidas acumuladas se han estimado en más de 7 mil millones de dólares (Escobedo-Bonilla *et al.* 2008). Altamente contagioso, el WSSV rápidamente se diseminó de Asia a América a mediados de los 90, convirtiéndose en un virus pandémico. Reportes indican que la mortalidad acumulada puede alcanzar 90-100% de 3 a 10 días después de la aparición de los signos clínicos de la infección (Flegel 1997, Lightner 1996). Ellos incluyen: falta de apetito (anorexia), movimiento lento (letargia) y expansión de cromatóforos en la epidermis lo que provoca un cambio de coloración de translúcido a rosado ó café (Inouye *et al.* 1996). En los estanques, los animales infectados nadan lentamente de forma errática cerca de la superficie y eventualmente los camarones se van al fondo y mueren (Chang *et al.* 1996, Durand *et al.* 1997, Lightner 1996). Las primeras mortalidades, suceden 1 a 2 días posteriores a la aparición de signos clínicos (Kou *et al.* 1998).

Bajo condiciones de cultivo muchas especies de peneidos tanto asiáticas como americanas presentan la aparición de manchas o puntos blancos embebidas en la cutícula del exoesqueleto (Lo *et al.* 1996a, Wu *et al.* 2001). Esta característica es la que da el nombre a la enfermedad. No obstante, las manchas blancas pueden ser producidas por otros patógenos (bacterias) en camarón. Otras especies animales pueden resultar positivas a WSSV cuando se analizan por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). No obstante, esto no implica que dichas especies sean susceptibles a la infección de WSSV. Esto ha sido demostrado al menos en gusanos poliquetos (Supak *et al.* 2005, Vijayan *et al.* 2005) y en algunas especies de larvas de copépodos e insectos recolectadas en estanques (Flegel 1997, Lo *et al.* 1996b).

Desarrollo

Genoma del WSSV

El agente causante de la enfermedad de la mancha blanca es un virus con genoma de ADN de doble cadena, circular, de gran tamaño y con envoltura (Vlak *et al.* 2006). La secuencia completa de su genoma se determinó en tres aislados distintos de China, Tailandia y Taiwán,

respectivamente (Chen *et al.* 2002b, van Hulten *et al.* 2001, Yang *et al.* 2001). En total, ambas cadenas de su genoma contienen entre 531 a 684 marcos de lectura abierta ('open reading frames' ORFs, por sus siglas en inglés) formados por un codón de inicio ATG y uno de terminación. Entre ellos, 180 a 184 ORFs codifican para polipéptidos de 51 a 6,077 aminoácidos. Sin embargo, solamente algunos de esos ORFs son similares a los de otros genes virales conocidos e incluso a genes eucarióticos. La mayoría de las secuencias nucleotídicas presentan un bajo nivel de homología con los genes conocidos reportados en las bases de datos (GenBank, por sus siglas en inglés). Por esta razón no ha sido posible establecer la función de algunas de las proteínas que codifican (van Hulten *et al.* 2001, Yang *et al.* 2001).

El genoma de los tres aislados secuenciados del WSSV muestra diferencias en tamaño. El aislado chino tiene un tamaño de genoma de 305107 bp (número de acceso Genbank AF332093) con 181 ORFs los cuales presentan 50 ó más aminoácidos cada uno. El aislado de Taiwán presenta 307287 bp (Genbank AF440570) y el aislado de Tailandia que es el más pequeño cuenta con 292967 bp (Genbank AF369029). Esas variaciones de tamaño probablemente se deben a delecciones de aproximadamente 12 kpb, lo cual indica un grado de inestabilidad genética (Lan *et al.* 2006). En contraste, la identidad de los nucleótidos entre los tres genomas es del 99,3% (Marks 2005).

El análisis filogenético de las secuencias de genes de la ADN polimerasa y una proteína quinasa de los tres aislados del WSSV mostró que no pertenece a la familia Baculoviridae, a la cual había sido asignado inicialmente. Posteriormente, la información del genoma completo y la comparación de secuencias de varias proteínas estructurales y funcionales indicó que WSSV era un virus muy distinto a los baculovirus, lo cual llevó a la creación de una nueva familia para WSSV, la Nimaviridae, y la formación del género *Whispovirus* (van Hulten & Vlak 2001, Yang *et al.* 2001).

Proteoma del WSSV

El WSSV tiene genes que codifican tanto para proteínas estructurales como no estructurales. Los genes estructurales codifican las proteínas que forman el virión o cápside, mientras que los no estructurales codifican proteínas y enzimas involucradas en el metabolismo de nucleótidos y la replicación viral. Las proteínas estructurales (VP, 'viral protein' por sus siglas en inglés), son cruciales en la adhesión celular, en la transducción de señales, y en la evasión rápida del hospedero cuando son desplegadas sus defensas antivirales (Li *et al.* 2007). También son las primeras moléculas que interactúan con

las células del hospedero (Tsai *et al.* 2006), y pueden ser blancos importantes de su mecanismo de defensa celular. Las VP se designan por su masa molecular en kDa: VP19, VP28, VP15, VP24 y VP26. Las dos primeras están asociadas con la envoltura viral y las tres últimas son proteínas de la nucleocápside (van Hulten *et al.* 2000a, van Hulten *et al.* 2002, van Hulten *et al.* 2000b). Recientemente, el uso de la técnicas de alto rendimiento en la proteómica del WSSV ha hecho posible la caracterización y localización de muchas otras proteínas virales (Huang *et al.* 2002a). Mediante el uso de estas técnicas sobre la fracción proteica del virus se han reportado al menos 58 proteínas estructurales, incluyendo 13 recién identificadas en el virión de WSSV (Li *et al.* 2007).

Entre las proteínas no estructurales destacan las subunidades grande y pequeña de la ribonucleótido reductasa (Tsai *et al.* 2000a, van Hulten *et al.* 2000b). Así también, dos proteínas-quinasas (PKs) (van Hulten & Vlak 2001, Yang *et al.* 2001), el polipéptido quimérico timidina kinasa-timidilato monofosfato kinasa (TK-TMK) (Tsai *et al.* 2000b) y una ADN polimerasa (Chen *et al.* 2002).

Recientemente se ha sugerido una nueva clasificación para los genes de WSSV de acuerdo a la función de las proteínas que codifican (Sánchez-Martínez *et al.* 2007), siendo un tercer grupo el que comprende a las proteínas de latencia. Estas son sintetizadas durante las etapas tempranas de la infección y están involucradas en la persistencia del virus dentro de la célula hospedera (Flint *et al.* 2000). Un cuarto grupo es conformado por los genes reguladores temporales, los cuales intervienen en tiempos específicos durante el curso de la infección. La expresión de estos genes reguladores no requiere de la presencia de proteínas virales, ya que utilizan la maquinaria molecular del hospedero durante las primeras horas de la infección (Sánchez-Martínez *et al.* 2007).

Métodos para el estudio del proteoma del WSSV

Al momento en que se conoció la secuencia completa del genoma del WSSV solamente se conocía la función de un 6% de sus ORFs (van Hulten *et al.* 2001). Estos codifican tanto proteínas estructurales como no-estructurales y la aplicación de técnicas analíticas ha permitido identificar la función de muchas otras proteínas virales.

Los métodos para identificar y caracterizar proteínas estructurales incluyen métodos convencionales como la electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés). Adicionalmente la microscopia electrónica usando anticuerpos ligados a partículas de oro

(IEM, 'immunogold electron microscopy') y el análisis por 'Western blot' han sido utilizados en la localización de las proteínas dentro del virión (Li *et al.* 2007). Los estudios por IEM permitieron caracterizar y localizar a la proteína gigante VP664 (Tsai *et al.* 2004). Esta proteína forma un arreglo de subunidades globulares en forma de anillos apilados que dan la apariencia característica de la nucleocápside de WSSV (Leu *et al.* 2005).

Las técnicas como el 'Western blot' y el IEM requieren contar con anticuerpos monoclonales específicos debidamente caracterizados. Además, las dos técnicas han generado resultados controversiales en cuanto a la localización de proteínas. Un ejemplo es la VP466. Esta proteína fue originalmente localizada en la envoltura usando IEM, mientras que por 'Western blot' fue localizada en la nucleocápside (Huang *et al.* 2002a, Tsai *et al.* 2006). Es probable que por la estructura del virión y las técnicas usadas en la separación de los componentes del mismo se obtengan localizaciones distintas (Li *et al.* 2007). Esto mismo probablemente ha dificultado la correcta diferenciación de las proteínas, provocando que varias proteínas estructurales originalmente localizadas en la envoltura, después han sido ubicadas en la nucleocápside (Li *et al.* 2007).

Otros métodos recientemente usados para caracterizar proteínas estructurales de WSSV han incluido técnicas de proteómica de alto rendimiento tipo 'shotgun' y de etiquetas isobáricas para la cuantificación absoluta y relativa (iTRAQ, 'isobaric tags for relative and absolute quantification', por sus siglas en inglés). El procedimiento 'shotgun' involucra la digestión directa de proteínas hasta formar una mezcla de péptidos (Marcotte 2007). Esta es seguida por la identificación automatizada de los péptidos por espectrometría de masas (LC-MS/MS). Posteriormente la secuencia parcial de los péptidos es comparada con bases de datos (Escobedo-Bonilla *et al.* 2008, Sánchez-Martínez *et al.* 2007).

La técnica de IEM, permitió la localización de 13 proteínas de la envoltura y una de la nucleocápside (Huang *et al.* 2002a, b). El método de 'Western blot' diferenció siete proteínas de la envoltura, cinco del tegumento y cuatro de la nucleocápside (Tsai *et al.* 2006). Adicionalmente, la espectrometría de masas contribuyó a la localización de dos proteínas de la nucleocápside.

Discriminación de proteínas de envoltura y de la cápside del WSSV

Un análisis electroforético de las proteínas totales del virus no permite distinguir de las proteínas de cápside o de la envoltura del virus. Es evidente que cualquier estrategia de neutralización viral debería estar dirigida a las proteínas de envoltura, pues son las que interactúan con las células blanco del camarón. El método de iTRAQ

es una estrategia proteómica cuantitativa empleada para distinguir entre las proteínas de la envoltura y la nucleocápside viral del WSSV (Li *et al.* 2007). La determinación está basada en el enriquecimiento de las proteínas. El principio de la técnica se basa en el uso de isótopos radioactivos que permite el análisis simultáneo de hasta cuatro muestras por experimento. Los marcajes son isobáricos (modificaciones químicas al aminoácido lisina de la misma masa molecular), y presentan una distribución diferente de isótopos entre la muestra control (no infectado) y el tejido infectado (Unwin *et al.* 2005). Con iTRAQ fue posible determinar la ubicación de 42 proteínas estructurales, 33 de las cuales están localizadas en la envoltura y 9 en la nucleocápside. La importancia de estos estudios es que una buena identificación de las proteínas estructurales de WSSV y su localización deberían facilitar los estudios de su ensamble y mecanismo de infección (Li *et al.* 2007). La identificación de las proteínas de cápside permitirá evaluar el efecto de péptidos y anticuerpos neutralizantes, mientras que otras estrategias podrían estar dirigidas a bloquear el ensamblaje de la envoltura viral.

Mecanismo molecular de la infección del WSSV

El mecanismo de entrada del WSSV a la célula hospedera es poco conocido. La infección se inicia cuando un virión se une a la superficie de una célula objetivo o diana (Fig. 1) (Jiravanichpaisal *et al.* 2006). Una o varias moléculas superficiales en las células de tejidos blanco susceptibles

a WSSV podrían funcionar como receptores virales. Es posible que exista un evento inicial de reconocimiento molecular (Fig. 1A) y que posteriormente se den interacciones moleculares posteriores. Un ejemplo son los dominios tipo integrina, los cuales están presentes en las membranas de los hemocitos y células hematopoyéticas en muchos crustáceos (Jiravanichpaisal *et al.* 2006). Las integrinas son moléculas que frecuentemente sirven como receptores de los virus envueltos. Algunas proteínas de la envoltura viral tienen motivos RGD (arginina-glicina-acido aspártico) que pueden mediar la adhesión del virus a la integrina celular (Fig. 1B). Los tripéptidos RGD tiene funciones de reconocimiento celular e infectividad en una gran variedad de patógenos (Li *et al.* 2006). Ejemplos son el virus del herpes humano 8 (Wang *et al.* 2003), y el virus de la hepatitis A (Chávez *et al.* 2001). En el genoma del WSSV al menos seis proteínas estructurales presentan motivos RGD. Entre ellos la VP31, VP36A, VP36B, VP110, VP136, VP281 y la VP664 (Huang *et al.* 2002b, Yang *et al.* 2001). Adicionalmente se ha reportado que el residuo de treonina a la derecha de un motivo RGD es importante para la interacción con las integrinas (Plow *et al.* 2000). En la secuencia del gen wsv432, el residuo de treonina es reemplazado por una serina, implicando que esta podría presentar actividad de adhesión celular importante para la entrada del virus al hospedero (Li *et al.* 2007). Esta posibilidad ha sido sugerida para crustáceos (Jiravanichpaisal *et al.* 2006).

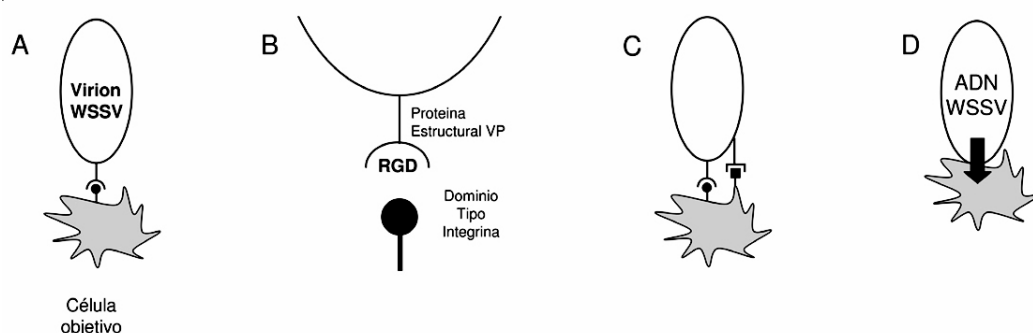


Figura 1

Modelos de la interacción molecular con las células del camarón durante la infección del virus de la mancha blanca (WSSV).

A) La interacción de la proteína estructural del virus ocurre en un receptor celular específico. B) Los dominios RGD (arginina-glicina-acido aspártico) interaccionan con regiones tipo integrina de los receptores celulares. C) Existe más de una interacción proteína estructural-receptor para que se establezca la infección viral. D) Finalmente al ocurrir la transferencia del material genético viral hacia la célula, se inicia la transcripción y síntesis de proteínas virales. ADN WSSV se refiere al genoma viral

Models for molecular interaction with shrimp cells during WSSV infection. A) Interaction between WSSV structural proteins occurs with a specific cellular receptor. B) The RGD domains (arginine-glycine-aspartic acid) interact with integrin-like domains in the shrimp cell receptors. C) More than one interaction occurs to establish the viral infection. D) Finally, the transfer of viral DNA to the target cell lets to transcription and translation of viral proteins. ADN WSSV refers to viral genome

Es muy posible que la infección viral requiera de más de una interacción molecular. Una posibilidad es que existan otros receptores para otras proteínas estructurales virales (Fig. 1C). Recientemente, Sritunyaluksana *et al.* (2006) identificaron y caracterizaron una proteína homóloga a Rab en crustáceos. Las proteínas Rab son conocidas por ser reguladoras de la formación de vesículas y por participar en eventos de fusión. Las Rab también actúan como controladoras del tránsito de las vesículas endocíticas al interior de las células y en la subsecuente fusión a los endosomas (Sritunyaluksana *et al.* 2006). La unión específica de la proteína Rab7 del camarón *Penaeus monodon* (PmRab7) a la proteína estructural VP28 de WSSV ha sido ya descrita (Sritunyaluksana *et al.* 2006). Experimentos de unión de WSSV a proteínas celulares han revelado que tres proteínas de la membrana de los hemocitos del camarón están involucradas con la unión de WSSV. Una de ellas es la WBP 25, una pequeña proteína de enlace muy similar al trifosfato de guanidina (GTP), la cual guarda similitud con la proteína Rab7 encontrada en plantas y animales. Este tipo de moléculas son muy utilizadas por muchos virus como rutas endocíticas (Sritunyaluksana *et al.* 2006). Modificaciones cruciales post-traducción tales como la isoprenilización de dos de sus cisteínas, son las que permiten a las proteínas Rab asociarse a la membranas celulares. Es probable que la proteína de enlace GTP Rab7 funcione como receptor para la VP28.

Muchos de los virus utilizan la endocitosis como una ruta de entrada a las células del hospedero (Sieczkarski & Whittaker 2002). Varios virus se unen a los receptores de la superficie de la célula para luego ser internalizados por las redes endocíticas en una forma clatrina-dependiente (Sritunyaluksana *et al.* 2006). Estudios *in vivo* efectuados en camarones han mostrado que anticuerpos dirigidos contra la PmRab7 o la administración de PmRab7 a los animales bloqueó una infección de WSSV. La mortalidad en camarones inyectados con PmRab7 fue de 15% y animales tratados con el anti-Rab7 tuvieron mortalidad de 5%. No se ha establecido si PmRab7 está localizado en la superficie de los hemocitos, ó si se encuentra exclusivamente en el citoplasma (Sritunyaluksana *et al.* 2006). Finalmente, ocurre la internalización del genoma viral hacia la célula objetivo, donde ocurre la transcripción y traducción de los genes virales, para dar lugar a la síntesis de proteínas virales, ensamblaje de nuevos viriones y dar lugar al establecimiento de la infección (Fig. 1D).

Virulencia de WSSV

Durante el curso de brotes infecciosos en el campo se han determinado tres tipos de severidad en mortalidad:

hiperaguda, aguda y crónica (Sudah *et al.* 1998). Es posible que el proceso de diseminación del patógeno a otros países y diversos hospederos, haya dado lugar a variantes del WSSV con características específicas, incluyendo la virulencia (Rahman *et al.* 2008). La virulencia se define como una propiedad cuantitativa de la potencia de un agente patógeno para producir enfermedad en un grupo o especie (Shapiro-Ilan *et al.* 2005). La virulencia de WSSV ha sido evaluada como el tiempo letal medio (LT_{50}) y se define como el tiempo requerido por un inóculo viral para causar 100% de mortalidad en un grupo de camarones (Marks 2005).

Las tres secuencias genómicas publicadas de WSSV muestran diferencias en dos regiones polimórficas de aproximadamente 14 kpb, las cuales no han sido relacionadas con la virulencia (Sánchez-Martínez *et al.* 2007). Otro estudio encontró una región inestable de 9.6 kpb en el genoma de la variante China de WSSV. En esta región se ha registrado una alta tasa de deleciones espontáneas. Dichas deleciones son de distintos tamaños las cuales pueden depender de la especie hospedera donde WSSV se replicó, y podrían tener un papel importante en la virulencia de la variante de WSSV (Lan *et al.* 2002). Sin embargo, no se han realizado estudios detallados para evaluar el efecto de dicha delección sobre la virulencia del aislado chino.

Un estudio reciente determinó diferencias en virulencia de tres aislados de WSSV (Tai-1, Tai-2 y Vietnam 1) utilizando un modelo de inoculación experimental altamente estandarizado. El aislado Tai-1 fue el más virulento, con un desarrollo rápido de la enfermedad y causando 100% de mortalidad en pocos días. La LT_{50} de este aislado fue de 46,9 hpi. El aislado Tai-2 fue un poco menos virulento que el aislado Tai-1 y su LT_{50} fue 60,8 hpi. El aislado de Vietnam fue el menos virulento, induciendo una forma crónica de la enfermedad y un tiempo mucho mayor de supervivencia. El LT_{50} de este aislado fue de 119,7 hpi. La diferencia en virulencia entre estos aislados se relacionó con el número de células infectadas en branquias. Los aislados más virulentos infectaban un mayor número de células branquiales. Esto podría deberse a diferencias genómicas encontrados entre los aislados tailandeses y el vietnamita, aunque no se han establecido las diferencias en el genoma de esos aislados (Rahman *et al.* 2008).

Otros estudios *in vivo* han confirmado que de las tres variantes completamente secuenciadas, la más virulenta es la de Tailandia (WSSV-TH). Esta última provocó el 50% de mortalidad acumulativa en *Penaeus monodon* en solo dos días (Marks 2005). Estudios llevados a cabo con *L. vannamei* acerca del efecto de la hipertermia sobre la

supervivencia de camarones infectados con WSSV confirmaron esta información (Rahman *et al.* 2007). Por otro lado, la virulencia entre distintos aislados de WSSV en América también ha sido comparada. Wang *et al.* (1999) encontraron que un aislado de Texas fue el más virulento respecto de otros, mientras que el aislado de Washington en un crustáceo de agua dulce fue el menos virulento. Además, diferencias en susceptibilidad han sido encontradas en distintas especies de camarón (Wang *et al.* 1999). Ha sido sugerido también que los animales que sobreviven una infección por WSSV pueden adquirir 'resistencia' a brotes subsecuentes de WSSV y como consecuencia, mayor supervivencia (Venegas *et al.* 2000).

Otros estudios han sugerido una relación entre el tamaño del genoma y la virulencia. Por ejemplo, ha sido reportado que una variante de WSSV de Tailandia con el tamaño de genoma más pequeño (292,7 kb) puede ser más virulento. El tiempo letal medio de animales infectados con este virus fue de 3,5 días. En cambio, una variante tailandesa (WSSV-TH-96-II) considerada ancestral por el tamaño más grande de su genoma (312 kb) indujo un LT_{50} de 14 días (Marks 2005). Aún cuando sería necesario realizar una comparación a nivel genómico de dichos aislados con virulencia diferente, sería importante evaluar los niveles de expresión de los genes tempranos en las etapas iniciales de la infección. Posiblemente existen regiones intergénicas que reducen la eficiente expresión de esos genes en el genoma ancestral, que ha evolucionado de una forma más compacta y eficaz en producir la infección en el camarón.

Regulación transcripcional en el camarón durante la infección por el WSSV

Los microarreglos son una herramienta eficiente para hacer análisis transcripcional (Wang *et al.* 2006). Con esta técnica es posible monitorear la expresión de un gran número de genes en el contexto de un sistema biológico (Lan *et al.* 2002). Específicamente se han usado microarreglos para estudiar la expresión diferencial de genes durante la infección por el WSSV. Con esta herramienta se han podido observar cambios importantes en la expresión genética de camarones infectados. Los microarreglos han permitido identificar nuevos genes relacionados al metabolismo, estrés y defensa del camarón.

La expresión particular de ciertos genes del camarón ha sido ya estudiada durante las primeras etapas de la infección de WSSV (Wang *et al.* 2006). Los genes sobre-expresados ('up-regulated') incluyen aquellos que codifican proteínas de choque térmico ('heat shock proteins' HSP) denominadas HSP70 y HSP90, factores

de elongación entre otras. Ellas participan en el crecimiento celular y en las funciones inmunes del camarón. Dado que las proteínas chaperonas HSP70 y HSP90, participan activamente en la respuesta de defensa durante la etapa inicial de la infección, al modificarse su expresión durante la infección, esto favorece el establecimiento del WSSV en el camarón (Wang *et al.* 2006).

Los genes sub-expresados ('down-regulated') (incluyen aquellos que codifican para arginina kinasa (AK) y trifosfato de adenosina (ATP) sintasa. Estos genes están involucrados en el metabolismo y homeostasis y son expresadas significativamente durante la infección (Wang *et al.* 2006). Se cree que la AK podría fluctuar de acuerdo al estadio de infección de WSSV ya que dicha enzima juega un papel en el metabolismo de la energía del camarón. Lo mismo sucede con la ATP sintasa afectando la habilidad para montar una respuesta de defensa.

Otros estudios han mostrado una reducción en la expresión de una proteína de la cutícula denominada DD9A. Esta proteína participa en la calcificación del exoesqueleto. La sub-expresión de esta proteína afecta la asimilación de calcio (Watanabe *et al.* 2000). Se cree que la sub-regulación de DD9A podría estar involucrada en la aparición de las manchas blancas en el exoesqueleto de animales infectados con WSSV. Debido a que estas manchas son depósitos anormales de sales de calcio, es posible que su aparición este relacionada a la pérdida de función de células epiteliales infectadas con WSSV. Las células epiteliales intervienen en la asimilación de calcio para formar el exoesqueleto. Es posible que la expresión de DD9A sea esencial en dichas células. Más aún, es posible que la infección de WSSV pudiera llegar a afectar el metabolismo del calcio en el camarón (Wang *et al.* 2006). El calcio es un componente muy importante en procesos metabólicos en una gran variedad de tejidos (Harnett & Biancani 2003). Varios factores relacionados a la respuesta de defensa son calcio-dependientes, tales como las transglutaminasas. Por lo tanto, la disminución de la regulación del calcio podría tener efectos muy graves en la homeostasis del camarón (Wang *et al.* 2006). Los cambios en la expresión de genes de camarón como resultado de la infección de WSSV resultan por lo tanto en la pérdida de función del sistema de defensa del animal. Otros genes relacionados con la defensa son el factor antilipopolisacárido, las serina proteasas y péptidos antimicrobiales como las peneidinas los cuales también podrían resultar afectados por la infección de WSSV (Liu *et al.* 2005). El estudio de los cambios de expresión génica permitirá avanzar en el conocimiento de la función de

genes con un papel importante en el sistema de defensa del camarón.

Estrategias contra el virus de la mancha blanca: proteínas estructurales vs. no estructurales

Los invertebrados no poseen un sistema de defensa adaptativa con células de memoria como en los vertebrados (Vaseeharan *et al.* 2006). No obstante, ellos cuentan con mecanismos de defensa innata muy sofisticados. En estudios de infección *in vivo* con WSSV en el camarón *Marsupenaeus japonicus* se observó la presencia de una respuesta ‘cuasi-inmune’ tanto en camarones infectados naturalmente como aquellos infectados artificialmente con WSSV (Venegas *et al.* 2000). Dichos resultados sugieren la existencia de una respuesta de defensa antiviral específica en camarones (Vaseeharan *et al.* 2006).

Muchas estrategias de control dirigidas contra WSSV se basan en el uso de proteínas estructurales. Las proteínas estructurales son clave en el proceso de infección. Estas participan en los procesos iniciales de infección como adhesión y penetración del virión a la célula hospedera. Por lo tanto, el bloqueo de la infección en las etapas iniciales es un posible método de control viral. Se ha

reportado, por ejemplo, la activación del sistema de defensa del camarón al inyectar a los organismos con proteínas recombinantes de la envoltura de WSSV (Witteveldt *et al.* 2004b). En otros estudios, la administración de la proteína de la envoltura de WSSV VP292 produjo un aumento de la supervivencia de camarones infectados (Vaseeharan *et al.* 2006) (Fig. 2A). Otras proteínas de la envoltura de WSSV usadas para reducir el impacto de la infección de WSSV incluyen la VP31, VP33 (VP36b) y la proteína del tegumento (VP36A) (Li *et al.* 2006b). La VP31 inhibió la adhesión de WSSV a las células del hospedero y se reportó una reducción significativa de la mortalidad del camarón. Lo anterior es una indicación de que varias proteínas virales tienen un papel importante en el proceso de penetración a la célula. Dado que no se conoce ningún mecanismo de inmunidad adaptativa bajo la cual se desencadene una verdadera respuesta inmune en contra de las proteínas virales, se puede proponer un mecanismo de competencia celular. Bajo este mecanismo, las proteínas recombinantes inyectadas competirían por los receptores de los tejidos blanco, de esta manera reduciendo la infección viral (Fig. 2A). Dado que no hay evidencias o mecanismos que expliquen estos resultados, estos se consideran

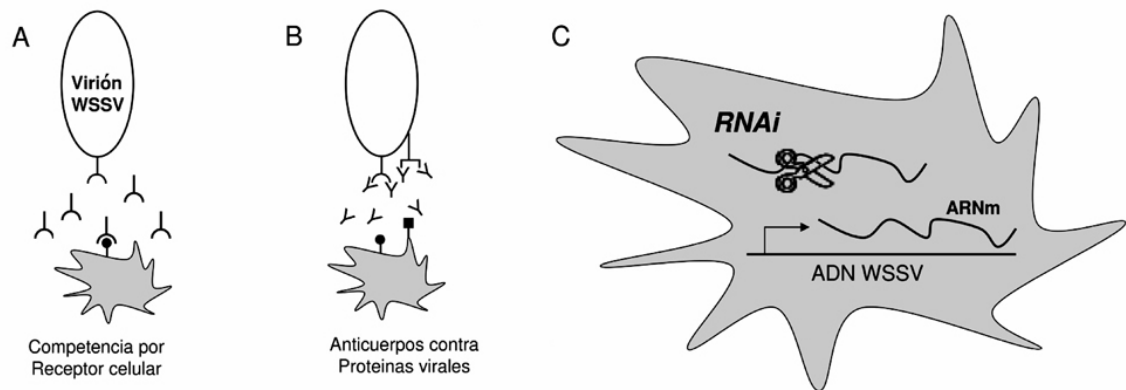


Figura 2

Estrategias moleculares para prevenir la infección por WSSV. A) Inyección de proteínas estructurales virales recombinantes, las cuales compiten por la unión a los receptores celulares. De esta manera, se evita la interacción con el virión. B) Inyección de anticuerpos contra las proteínas virales, los cuales reaccionan con el virus y evitan la interacción con los receptores celulares. C) RNAi o ARN de interferencia, en esta técnica, se evita la síntesis de proteínas virales al producir la degradación de los ARN mensajeros al inyectar ARN de doble cadena del gen de interés

Molecular strategies to prevent viral infection by WSSV. A) Injection of recombinant structural viral proteins, which compete for binding of cellular receptors. This way, the interaction with viral particle is prevented. B) Injection of antibodies against viral proteins, which bind and prevent binding to target cell receptors in shrimp. C) RNAi or interference RNA, which prevents synthesis of viral proteins by degradation of their messenger RNAs, by injection of double-stranded RNA of the viral target gene

controversiales. Definitivamente se requiere de más estudios básicos sobre los mecanismos de inmunidad innata en invertebrados para entender estos resultados.

Recientemente se ha identificado un gen con función putativa 'antiviral' (PmAV) en el camarón *Penaeus monodon*. Estudios *in vitro* hechos con la proteína recombinante PmAV, demostraron que tiene una potente actividad antiviral en una línea celular de *Epinephelus tauvina* infectados con un iridovirus (SGIV) (Luo *et al.* 2003). Este tipo de estudios contribuye al conocimiento de nuevos efectores de defensa antiviral presentes en invertebrados marinos que pueden ser usados para controlar enfermedades virales. Otras proteínas recombinantes usadas para reducir el efecto de la infección de WSSV incluyen la proteína PmRab7 del camarón *P. monodon* (Sritunyaluksana *et al.* 2006).

Ensayos de neutralización *in vivo* utilizando anticuerpos en contra de diferentes proteínas estructurales han mostrado la capacidad de retardar significativamente la mortalidad en camarones infectados con el WSSV. Ejemplos son el uso de anticuerpos policlonales dirigidos contra proteínas estructurales como la VP19 y VP28 (Witteveldt *et al.* 2004a). Nuevamente, esta estrategia puede ser explicada por un mecanismo de competencia, interfiriendo entre la interacción de los receptores celulares y las proteínas estructurales virales (Fig. 2B)

Una nueva estrategia antiviral contra WSSV es el ARN de interferencia (RNAi, por sus siglas en inglés). Esta técnica se basa en bloquear la expresión genética del virus por medio del silenciamiento de ciertos genes, al producir la degradación del ARN mensajero del gen de interés (Fig. 2C). Los genes virales que codifican las proteínas estructurales VP19 y VP28 han sido interferidos o silenciados para inhibir la replicación viral. Este mecanismo induce una respuesta antiviral específica que inhibe la infección por WSSV y reduce significativamente la mortalidad (Robalino *et al.* 2005, Robalino *et al.* 2004). Se asume que el desbalance en la síntesis de las proteínas virales por efecto del silenciamiento reduce la eficiencia del ensamblaje del virion y por tanto se reduce la mortalidad del camarón.

Resultados similares han sido reportados en *Fenneropenaeus chinensis* administrando ARN de doble cadena dirigido contra las proteínas VP281, VP28 y la PK (Kim *et al.* 2007). En el camarón tigre *Penaeus monodon* se redujo la infección silenciando los genes *vp15* y *vp28* (Westenberg *et al.* 2005). Otro estudio reporta la completa inhibición de la infección por WSSV mediante tres inyecciones consecutivas de RNAi corto dirigido contra VP28 en *Marsupenaeus japonicus* (Xu *et al.* 2007). Considerando que es poco factible inyectar camarones

individuales en estanques de producción, la aplicación de la técnica de silenciamiento génico tendría que ser desarrollada primero para la síntesis en gran escala del ARN de doble cadena. Posteriormente, se tendrían que encontrar métodos para estabilizarlo y poder administrarlo en la dieta de los camarones, para poder ser una opción terapéutica contra WSSV y otros virus de este tipo.

Tendencias futuras

Es necesario tener una mejor comprensión de las interacciones entre el hospedero y el patógeno para desarrollar métodos efectivos de control de enfermedades infecciosas en camarón. Es posible interferir en el proceso de la infección por WSSV por medio de la modificación o inhibición de la expresión genética del virus en las etapas iniciales de la replicación viral. Estrategias dirigidas a bloquear la adhesión/penetración de viriones en células susceptibles requiere conocer los receptores celulares y sus ligandos en la superficie viral. Resulta también muy prometedora la posibilidad de encontrar nuevos co-receptores en las células del hospedero. Esas investigaciones serán muy importantes para estudiar los mecanismos de la entrada viral y de la replicación dentro de las células del camarón. La aplicación de nuevos métodos moleculares permitirá identificar y localizar proteínas estructurales dentro del virión acelerando el proceso para el descubrimiento de nuevas estrategias para el combate de la infección.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo a CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) de México, por el proyecto 48991-Z a R. Sotelo-Mundo. M. Bustillo-Ruiz recibió una beca para estudios de posgrado del CONACYT. Los autores Bustillo-Ruiz y Escobedo-Bonilla contribuyeron igualmente al trabajo. También se agradece a la Prof. Gloria Yepiz Plascencia por sus sugerencias y edición al manuscrito y a los evaluadores por sus comentarios y recomendaciones.

Literatura citada

- Chang PS, CF Lo, YC Wang & GH Kou. 1996. Identification of white spot syndrome virus associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. *Diseases of Aquatic Organisms* 27: 131-139
- Chávez A, M Pujol, M Alsina & Y Cajal. 2001. Membrane fusion by an RGD- containing sequence from the core protein VP3 of hepatitis A virus and the RGA-analogue. *Biopolymers* 58: 63-77.
- Chen LL, HC Wang, CJ Huang, SE Peng, YG Chen, SJ Lin, WY Chen, CF Dai, HT Yu, CH Wang, CF Lo & GH

- Kou. 2002.** Transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of shrimp white spot syndrome virus. *Virology* 301: 136-147.
- Chou HY, CY Huang, CH Wang, HC Chiang & CF Lo. 1995.** Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms* 23: 165-173.
- Durand S, DV Lightner, RM Redman & JR Bonami. 1997.** Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus. *Diseases of Aquatic Organisms* 29: 205-211.
- Escobedo-Bonilla CM, V Alday-Sanz, M Wille, P Sorgeloos, MB Pensaert & HJ Nauwynck. 2008.** A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *Journal of Fish Diseases* 31: 1-18.
- Flegel TW. 1997.** Special topic review: Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 13: 433-442.
- Flint S, L Enquist, R Krug, V Racaniello & A Skalka. 2000.** Principles of virology: Molecular biology, pathogenesis and control of animal viruses, 944 pp. ASM Press, Washington.
- Harnett KM & P Biancani. 2003.** Calcium-dependent and calcium independent contractions in smooth muscles. *The American Journal of Medicine* 115: 24S-30S.
- Huang C, X Zhang, Q Lin, X Xu & CL Hew. 2002a.** Characterization of a novel envelope protein (VP281) of shrimp white spot syndrome virus by mass spectrometry. *Journal of General Virology* 83: 2385-2392.
- Huang C, X Zhang, Q Lin, X Xu, Z Hu & CL Hew. 2002b.** Proteomic analysis of shrimp white spot syndrome viral proteins and characterization of a novel envelope protein VP466. *Molecular & Cellular Proteomics* 1: 223-231.
- Inouye K, S Miwa, N Oseko, H Nakano, T Kimura, K Momoyama & M Hiraoka. 1994.** Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. *Fish Pathology* 29: 149-158.
- Inouye K, K Yamano, N Ikeda, T Kimura, H Nakano, K Momoyama, J Kobayashi & S Miyajima. 1996.** The penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), which causes penaeid acute viremia. *Fish Pathology* 31: 39-45.
- Jiravanichpaisal P, K Soderhall & I Soderhall. 2006.** Characterization of white spot syndrome virus replication in in vitro-cultured haematopoietic stem cells of freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of General Virology* 87: 847-854.
- Kim CS, Z Kosuke, YK Nam, SK Kim & KH Kim. 2007.** Protection of shrimp (*Penaeus chinensis*) against white spot syndrome virus (WSSV) challenge by double-stranded RNA. *Fish and Shellfish Immunology* 23: 242-246.
- Kou GH, SE Peng, YL Chiu & CF Lo. 1998.** Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. En: Flegel TW (ed). *Advances in shrimp biotechnology*, pp. 267-271. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology Bangkok.
- Lan Y, W Lu & X Xu. 2002.** Genomic instability of prawn white spot bacilliform virus (WSBV) and its association to virus virulence. *Virus Research* 90: 264-274.
- Lan Y, X Xu, F Yang & X Zhang. 2006.** Transcriptional profile of shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes with DNA microarray. *Archives of Virology* 151: 1723-1733
- Leu JH, JM Tsai, HC Wang, AHJ Wang, CH Wang, GH Kou & CF Lo. 2005.** The unique stacked rings in the nucleocapsid of the white spot syndrome virus virion are formed by the major structural protein VP664, the largest viral structural protein ever found. *Journal of Virology* 79: 140-149.
- Li LJ, JF Yuan, CA Cai, WG Gu & ZL Shi. 2006.** Multiple envelope proteins are involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection in crayfish. *Archives of Virology* 151: 1309-1317.
- Li Z, Q Lin, J Chen, JL Wu, TK Lim, SS Loh, X Tang & CL Hew. 2007.** Shotgun identification of the structural proteome of shrimp white spot syndrome virus and iTRAQ differentiation of envelope and nucleocapsid subproteomes. *Molecular and Cellular Proteomics* 6: 1609-1620.
- Lightner DV. 1996.** A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp, 305 pp. World Aquaculture Society, Baton Rouge.
- Liu F, Y Liu, F Li, B Dong & J Xiang. 2005.** Molecular cloning and expression profile of putative antilipopolysaccharide factor in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Marine Biotechnology* 7: 600-608.
- Lo CF, JH Leu, CH Ho, CH Chen, SE Peng, YT Chen, CM Chou, PY Yeh, CJ Huang, HY Chou, CH Wang & GH Kou. 1996a.** Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimp using polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms* 25: 133-141.
- Lo CF, CH Ho, SE Peng, CH Chen, HC Hsu, YL Chiu, CF Chang, KF Liu, MS Su, CH Wang & GH Kou. 1996b.** White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Diseases of Aquatic Organisms* 27: 215-225.
- Luo T, X Zhang, Z Shao & X Xu. 2003.** PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. *FEBS Letters* 51: 53-57.
- Marcotte E. 2007.** How do shotgun proteomics algorithms identify proteins?. *Computational Biology* 25: 755-757.
- Marks H. 2005.** Genomics and transcriptomics of white spot syndrome virus. PhD Thesis, Universidad de Wageningen. Wageningen, 152 pp.
- Plow EF, TA Haas, L Zhang, J Loftus & JW Smith. 2000.** Ligand binding to integrins. *Journal of Biological Chemistry* 275: 21785-21788.
- Rahman MM, M Corteel, JJ Dantas-Lima, M Wille, V Alday Sanz, MB Pensaert, P Sorgeloos & HJ Nauwynck. 2007.** Impact of daily fluctuations of optimum (27°C) and high water temperature (33°C) on *Penaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture* 269: 107-113.

- Rahman MM, M Corteel, CM Escobedo-Bonilla, M Wille, V Alday-Sanz, MB Pensaert, P Sorgeloos & HJ Nauwynck. 2008. Virulence of white spot syndrome virus (WSSV) isolates may be correlated with the degree of replication in gills of *Penaeus vannamei* juveniles. *Diseases of Aquatic Organisms* 79: 191-198.
- Robalino J, CL Browdy, S Prior, A Metz, P Parnell, P Gross & G Warr. 2004. Induction of antiviral immunity of double-stranded RNA in a marine invertebrate. *Journal of Virology* 78: 10442-10448.
- Robalino J, T Bartlett, EF Shepard, S Prior, G Jaramillo, E Scura, RW Chapman, PS Gross, CL Browdy & GW Warr. 2005. Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to non-specific immunity in marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response?. *Journal of Virology* 79: 13561-13571.
- Rosenberry R. 2001. World shrimp farming 2000. *Shrimp News International* 13: 1-324.
- Sánchez-Martínez JG, G Aguirre-Guzmán & H Mejía-Ruiz. 2007. White spot syndrome virus in cultured shrimp: A review. *Aquaculture Research* 38: 1339-1354.
- Shapiro-Ilan DI, JR Fuxa, LA Lacey, DW Onstad & HK Kaya. 2005. Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. *Journal of Invertebrate Pathology* 88: 1-7.
- Sieczkarski SB & GR Whittaker. 2002. Dissecting virus entry via endocytosis. *Journal of General Virology* 83: 1535-1545.
- Sritunyalucksana K, W Wannapapho, CF Lo & TW Flegel. 2006. PmRab7 is a VP28-binding protein involved in white spot syndrome virus infection in shrimp. *Journal of Virology* 80: 10734-10742.
- Sudah P, C Mohan, K Shankar & A Hedge. 1998. Relationship between white spot syndrome virus infection and clinical manifestation in Indian cultured penaeid shrimp. *Aquaculture* 167: 95-101.
- Supak LS, A Boonnat, P Poltana, P Kanchanaphum, W Gangnonngiw, G Nash & B Withyachumnarnkul. 2005. Infectivity of white spot syndrome virus (WSSV) to the polychaete *Pereneis nuntia* and a possibility of WSSV transmission from the polychaete to the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. En: Walker PJ, R Lester & MG Bondad-Reantaso (eds). *Diseases in Asian aquaculture V*. Fish Health Section, pp. 353-361. Asian Fisheries Society, Manila.
- Tsai M-F, CF Lo, MCW van Hulten, HF Tzeng, CM Chou, CJ Huang, CH Wang, JY Lin, JM Vlak & GH Kou. 2000a. Transcriptional analysis of the ribonucleotide reductase genes of shrimp white spot syndrome virus. *Virology* 277: 92-99.
- Tsai JM, HC Wang, JH Leu, HH Hsiao, AHJ Wang, GH Kou & CF Lo. 2004. Genomic and proteomic analysis of thirty-nine structural proteins of shrimp white spot syndrome virus. *Journal of Virology* 78: 11360-11370.
- Tsai JM, HC Wang, JH Leu, AHJ Wang, Y Zhuang, PJ Walker, GH Kou & CF Lo. 2006. Identification of the nucleocapsid, tegument and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. *Journal of Virology* 80: 3021-3029.
- Tsai MF, HT Yu, HF Tzeng, JH Leu, CM Chou, CJ Huang, CH Wang, JY Lin, GH Kou & CF Lo. 2000b. 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. *Virology* 277: 100-110.
- Unwin R, A Pierce, RDS Watson & A Whetton. 2005. Quantitative proteomics analysis using isobaric protein tags enables rapid comparison of changes in transcript and protein levels in transformed cells. *Molecular and Cellular Proteomics* 4: 924-935.
- Van Hulten MCW & JM Vlak. 2001. Identification and phylogeny of a protein kinase gene of white spot syndrome virus. *Virus Genes* 22: 201-207.
- Van Hulten MCW, RW Goldbach & JM Vlak. 2000a. Three functionally diverged major structural proteins of white spot syndrome virus evolved by gene duplication. *Journal of General Virology* 81: 2525-2529.
- Van Hulten MCW, M Westenberg, SD Goodall & JM Vlak. 2000b. Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. *Virology* 266: 227-236.
- Van Hulten MCW, M Reijns, AMG Vermeesch, F Zandbergen & JM Vlak. 2002. Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins. *Journal of General Virology* 83: 257-265.
- Van Hulten MCW, J Witteveldt, S Peters, N Kloosterboer, R Tarchini, M Fiers, H Sandbrink, R Klein-Langhorst & JM Vlak. 2001. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology* 286: 7-22.
- Vaseeharan B, PT Anand, T Murugan & JC Chen. 2006. Shrimp vaccination trials with the VP292 protein of white spot syndrome virus. *Letters in Applied Microbiology* 43: 137-142.
- Venegas CA, L Nonaka, K Mushiake, T Nishizawa & K Muroga. 2000. Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV). *Diseases of Aquatic Organisms* 42: 83-89.
- Vijayan KK, V Stalin-Raj, CP Balasubramanian, SV Alavandi, V Thillai-Sekhar & TC Santiago. 2005. Polychaete worms-a vector for white spot syndrome virus (WSSV) *Diseases of Aquatic Organisms* 63: 107-111.
- Vlak JM, JR Bonami, TW Flegel, GH Kou, DV Lightner, CF Lo, PC Loh & PW Walker. 2006. *Nimaviridae*. En: Fauquet CM, MA Mayo, J Maniloff, U Desselberger & LA Ball (eds). *Virus taxonomy: VIII Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 187-192. Elsevier/Academic Press, London.

- Wang B, F Li, B Dong, X Zhang, C Zhang & J Xiang. 2006.** Discovery of the genes in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA microarray. *Marine Biotechnology* 8: 491-500.
- Wang F, S Akula, N Sharma-Walia, L Zeng & B Chandran. 2003.** Human herpesvirus 8 envelope glycoprotein B mediates cell adhesion via Its RGD sequence. *Journal of Virology* 77: 3131-3147.
- Wang Q, BL White, RM Redman & DV Lightner. 1999.** Per os challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. *Aquaculture* 170: 179-194.
- Watanabe T, P Persson, H Endo & M Kono. 2000.** Molecular analysis of two genes, DD9A and B, which are expressed during the postmolt stage in the decapod crustacean *Penaeus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, B: Biochemistry and Molecular Biology* 125: 127-136.
- Westenberg M, B Heinhuis, D Zuidema & JM Vlak. 2005.** siRNA injection induces sequence-independent protection in *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus. *Virus Research* 114: 133-139.
- Witteveldt J, JM Vlak & MCW van Hulten. 2004a.** Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine. *Fish and Shellfish Immunology* 16: 571-579.
- Witteveldt J, CC Cifuentes, JM Vlak & MCW van Hulten. 2004b.** Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. *Journal of Virology* 78: 2057-2061.
- Wu JL, A Namikoshi, T Nishizawa, K Mushiake, K Teruya & K Muroga. 2001.** Effects of shrimp density on transmission of penaeid acute viremia in *Penaeus japonicus* by cannibalism and the waterborne route. *Diseases of Aquatic Organisms* 47: 129-135.
- Xu J, F Han & X Zhang. 2007.** Silencing shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes by siRNA. *Antiviral Research* 73: 126-131.
- Yang F, J He, X Lin, Q Li, D Pan, X Zhang & X Xu. 2001.** Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *Journal of Virology* 75: 11811-11820.

Recibido el 4 de agosto de 2008 y aceptado el 26 de enero de 2009