



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

**“IDENTIFICACIÓN DE UNA MOLÉCULA ANTI-BACULOVIRUS
DE EXTRACTOS DEL EXOSQUELETO DE
LA LANGOSTILLA (*Pleuroncodes planipes*).”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

GUILLERMO GALVEZ ROMERO

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSÉ ÁLVARO AGUILAR SETIÉN

MÉXICO, D. F.

OCTUBRE 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

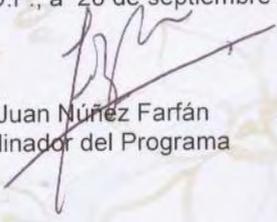
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 15 de junio de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **GALVEZ ROMERO GUILLERMO** con número de cuenta **506012062** con la tesis titulada **"IDENTIFICACIÓN DE UNA MOLÉCULA ANTI-BACULOVIRUS DE EXTRACTOS DEL EXOSQUELETO DE LA LANGOSTILLA (PLEURONCODES PLANIPES)"**, realizada bajo la dirección de la **DR. JOSÉ ALVARO AGUILAR SETIÉN**:

Presidente: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Vocal: DR. CUAUHTÉMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA
Secretario: DR. JOSÉ ALVARO AGUILAR SETIÉN
Suplente: M EN C. MONICA SALAS ROJAS
Suplente: DR. JUAN PABLO PARDO VAZQUEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 28 de septiembre de 2009.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

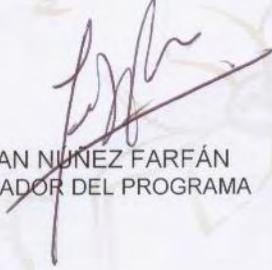
LIC. BALFRED SANTAELLA HINOJOSA

Coordinador de la Unidad de la Administración del Posgrado
Dirección General de la Administración Escolar
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su reunión ordinaria del 25 de junio de 2009, autorizó **una prórroga** hasta el **8 de octubre de 2009** al alumno **GALVEZ ROMERO GUILLERMO** con número de cuenta **506012062** para obtener el grado de **MESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 28 de septiembre de 2009.


DR. JUAN NÚÑEZ FARFÁN
COORDINADOR DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo durante la realización de mis estudios de posgrado.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al Centro Médico siglo XXI, IMSS.

Al Dr. José Álvaro Aguilar Setién por confiar en mí y brindarme su apoyo

A los Doctores: Juan Pablo Pardo Vázquez, Luis Felipe Jiménez García y Cuauhtémoc Juan Humberto Lanz Mendoza por sus valiosas aportaciones y sugerencias

A la M en C Mónica Salas Rojas por su apoyo moral y logístico en el laboratorio, además de sus valiosas observaciones en la redacción de este trabajo.

A todos mis compañeros de la Unidad en Investigación Médica en Inmunología del 3er piso del hospital de pediatría del Centro Médico Siglo XXI y en especial a mis queridos compañeros (as) del peine de virología.

DEDICADA.

A mi amada familia, Hugo y Ale, desearía haber estado con ustedes en todo momento, a cambio les ofrezco mis logros. Ar y don Memo sin sus sabios consejos, regaños y amor no estaría haciendo lo que me gusta, su presencia me hace sentirme muy afortunado y feliz
GRACIAS.

A mi amada Moni, admiro tu habilidad nata de investigadora científica, eres mi inspiración y dedicación.

A mis abuelos y tíos que siempre me fomentaron los estudios.

A mis queridos amigos Raúl y Gina, son mis hermanos del alma.

A mis inolvidables amigos del laboratorio Lety, Martha, Leo, Aidesita, Rafa, Cris, Nidia Miriam, Erick, Oswaldo, al equipo de la Dra. Lupita Rico y Dra. Karina Chavez por su apoyo en el laboratorio y por todos los buenos momentos que pase con ustedes.

ÍNDICE	página
ABREVIATURAS	4
RESUMEN	7
I. INTRODUCCIÓN	9
I.1 La langostilla <i>Pleuroncodes planipes</i>	9
I.2 Los baculovirus	11
I.2.1 El virus de la polihedrosis nuclear de <i>Autographa californica</i> (AcNPV)	11
I.2.2 El virus de la mancha blanca (WSSP)	13
I.3 Inmunidad en los crustáceos	14
I.3.1 La coagulación	14
I.3.2 El sistema profenol oxidasa (proPO)	15
I.3.3 Lectinas	18
I.3.4 Péptidos antimicrobianos	19
I.3.5 Antivirales	20
II. JUSTIFICACIÓN	23
III. HIPÓTESIS	23
IV. OBJETIVOS	23
V. MATERIAL Y MÉTODOS	24
V.1 Cultivo de células Sf9	24
V.2 Producción del virus AcNPV+GFP	24
V.3 Titulación del AcNPV+GFP	24
V.4 Área de recolecta de <i>Pleuroncodes planipes</i>	25
V.5 Procesamiento de las muestras	26
V.6 Inhibición de la infección de AcNPV+GFP en células de insecto Sf9	26
V.7 Precipitación de proteínas con sulfato de amonio	29
V.8 Tratamiento con calor de la fracción con mayor actividad antibaculovirus obtenida de la precipitación con sulfato de amonio	30
V.9 Separación con tubos Vivaspin® con corte de 30 kDa de la fracción con mayor actividad antibaculovirus obtenida de la precipitación con sulfato de amonio	30
V.10 Efecto dosis-respuesta del péptido de <i>P. planipes</i> contra el AcNPV	31

V.11 Ensayo de citotoxicidad del péptido inhibidor del AcNPV	31
VI. RESULTADOS	32
VI.1 Producción del virus AcNPV+GFP	32
VI.2 Titulación del AcNPV+GFP	32
VI.3 Procesamiento de las muestras	33
VI.4 Determinación del momento en que actúa la molécula inhibidora	34
VI.5 Precipitación de proteínas con sulfato de amonio	35
VI.6 Evaluación de las fracciones del extracto del exoesqueleto de <i>P. planipes</i> frente al AcNPV	36
VI.7 Tratamiento con calor del SN50%	37
VI.8 Evaluación de la fracción del SN50% sometida a calor (76° C) frente al AcNPV	38
VI.9 Evaluación de las fracciones obtenidas con tubos Vivaspin® con membrana de corte de 30 kDa contra el AcNPV	38
VI.10 Efecto dosis-respuesta del péptido de <i>P. planipes</i> contra el AcNPV	40
VI.11 Ensayo de citotoxicidad del péptido inhibidor del AcNPV	40
VI.12 Secuenciación del péptido antibaculovirus por espectrometría de masas	41
VII. DISCUSIÓN	43
VIII. CONCLUSIONES	49
IX. PERSPECTIVAS	49
X. BIBLIOGRAFÍA	50

ÍNDICE DE FIGURAS	página
Figura 1. Fotografía de <i>Pleuroncodes planipes</i>	10
Figura 2. Micrografía de microscopia electronica de los viriones del AcNPV	11
Figura 3. Representación grafica del ciclo infectivo del AcNPV	13
Figura 4. Micrografía del virión del WSSV	14
Figura 5. Representación general de la cascada de la proPO	17
Figura 6. Ubicación de Bahía Magdalena, B.C.S.	25
Figura 7. Esquema del experimento 1	27
Figura 8. Esquema del experimento 2	27
Figura 9. Esquema del experimento 3	28
Figura 10. Titulación del AcNPV	33
Figura 11. Gel de acrilamida al 12.5% de las muestras obtenidas del exoesqueleto de <i>P. planipes</i>	34
Figura 12. Determinación del momento de acción de la molécula inhibidora	35
Figura 13. Inibición del AcNPV por las fracciones resultantes del las precipitaciones con sulfato de amonio	36
Figura 14. SDS-PAGE del precipitado (PP76) y sobrenadante (SN76)	37
Figura 15. Inhibición del AcNPV por los productos del calentamiento del SN50	38
Figura 16. Inhibición del AcNPV por las fracciones <30 kDa y >30 kDa	39
Figura 17. Gráfica de dosis-respuesta del la molécula inhibidora	40
Figura 18. Porcentaje de células viables	41
Figura 19. Reporte obtenido del análisis por espectrometría de masas	42

ABREVIATURAS

° C	grados Celsius
xg	gravedades
μl	microlitros
μm	micrómetros
AcNPV	Virus de polihedrosis nuclear de <i>Autographa californica</i>
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BCS	Baja California Sur
BV	Virus que brotó
cADN	Ácido desoxiribonucleico complementario
CC	control de células
cm ²	centímetros cuadrados
CO	Cuerpo de oclusión
CRD	Dominio de reconocimiento de carbohidratos
CV	control de virus
DMSO	dimetil sulfóxido
dsARN	Ácido ribonucleico de doble hebra
ELISA	ensayo inmuno enzimático
g	gramos
GFP	proteína verde fluorescente
GP64	glicoproteína de 64 kDa

GPV	Granulovirus
h	horas
HSP	proteína de choque térmico
iARN	Ácido ribonucleico de interferencia
kDa	kiloDaltons
kpb	kilopares de bases
L	litro
LPM	La Piedad Michoacán (virus)
LPS	lipopolisacárido
mARN	Ácido ribonucleico mensajero
miARN	micro ácido ribonucleico de interferencia
min	minutos
ml	mililitros
MOI	multiplicidad de infección
MTT	Bromuro de tetrazolio 3-(3,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolio
nm	nanometros
NPV	Nucleopolyhedrovirus
ODV	Virus derivados de oclusión
pb	pares de bases
PBS	solución amortiguadora de fosfatos
pH	potencial de hidrógeno
ppA	enzima activadora de la proPO
PO	fenoloxidasa
PP	precipitado

proPO	profenoloxidasa
proppA	precursor de ppA
PRP	proteína que reconoce patrones
PRRs	receptores de reconocimiento de patrones
RPMI	Royal Park Memorial Institute (medio de cultivo)
s/s	sin suero
SDS-PAGE	electroforésis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
<i>Sf</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
Sf9	Línea celular de ovario de la larva de <i>Sf</i>
SFB	Suero fetal bovino
siARN	pequeño ácido ribonucleico de interferencia
SN	sobrenadante
Tm/año	Toneladas métricas por año
TPS	trehalosa fosfato sintetasa
UV	ultravioleta
WSSV	Virus del síndrome de la mancha blanca

RESÚMEN

Pleuroncodes planipes es un crustáceo, decápodo que se encuentra en altas densidades en las costas de Bahía Magdalena en Baja California Sur, México. Se ha utilizado experimentalmente como sustituto parcial en la alimentación de camarones en cultivo y se ha observado que no solo mejora el crecimiento, si no también la sobrevivencia de los organismos, pues disminuye la susceptibilidad a enfermedades infecciosas. Los crustáceos están expuestos a más de 30 enfermedades virales, de las cuales, el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) es considerado el principal agente infeccioso. Este virus comparte con miembros de la familia Baculoviridae características como: la morfogénesis de los viriones, la forma de vara de la nucleocápside, la conformación del material genético en doble hebra de ADN circular y la presencia de regiones repetidas dispersas en todo el ADN. Los invertebrados sólo dependen de la inmunidad innata para su protección contra virus y otros patógenos. Sin embargo, se han identificado diversos péptidos con propiedades antibacterianas y antimicóticas como las peneidinas, que inhiben la acción de hongos y bacterias; y las taquiplesinas, que además inhiben algunos virus. En cuanto a moléculas antivirales, se ha detectado actividad en extractos del músculo de crustáceos de importancia comercial en contra de una variedad de virus ADN y ARN, en donde el principal inhibidor resultó ser una molécula de 440 kDa. En un trabajo previo realizado por nuestro grupo, se detectó que una fracción menor de 50 kDa del extracto de exoesqueleto de la langostilla *Pleuroncodes planipes*, mostró actividad antiviral acentuada en contra del baculovirus, AcNPV, resultando de especial interés debido a su especificidad, bajo peso molecular y al hecho de que se encontró en un tejido que es la primera línea de defensa del organismo. Debido a lo anterior, el objetivo del trabajo fue identificar dicha molécula. Para cumplir con lo anterior se obtuvieron langostillas en la región de Bahía Magdalena, B.C.S, se procesaron las muestras del exoesqueleto para formar un extracto total, que fue fraccionado mediante precipitaciones con sulfato de amonio a diferentes porcentajes (40, 45 y 50 %), obteniendo sobrenadantes y precipitados con proteínas de diferentes pesos moleculares. Estas fracciones fueron evaluadas mediante la inhibición de la infección del AcNPV+GFP en células Sf9, para determinar cual conserva la actividad antiviral. Todas las fracciones redujeron el número de células infectadas frente al baculovirus, sin embargo, se decidió trabajar con el sobrenadante del 50% (SN50%), pues se tenía dos bandas protéicas bien

definidas. A esta muestra se le aplicó calor y se centrifugó para separar las proteínas de bajo peso molecular de las de alto peso molecular. Se detectó que la proteína de bajo peso molecular (alrededor de 10 kDa) conserva la actividad antibaculovirus, por lo que se analizó por espectrometría de masas. Se obtuvo una secuencia de aminoácidos que empata con una región de la miohemeritina, metaloproteína que funciona como transportadora de oxígeno ubicada en la pared del cuerpo de gusanos anélidos marinos, que incluye el exoesqueleto.

El hecho de que el péptido antiviral encontrado sea similar a una proteína tipo miohemeritina puede explicar su actividad, por que este tipo de proteínas son capaces de desestabilizar las membranas por presentar una conformación de hélice alfa y ser anfipáticas. Prueba de ello es que en la infección del AcNPV se emplean proteínas potenciadoras (enhancing), las cuales se han identificado como metaloproteasas, usadas para degradar metaloproteínas, como la miohemeritina encontrada en la pared del cuerpo. Para reafirmar el resultado de la secuenciación por espectrometría de masas se pretende secuenciar el péptido por degradación de Edman.

I. INTRODUCCION

I.1 LA LANGOSTILLA *Pleuroncodes planipes*

Dentro del Subphylum Crustacea se conocen más de 38,000 especies, de ellas se han descrito alrededor de 10,000 pertenecientes al Orden Decapoda que son, aproximadamente, un cuarto de las especies conocidas de crustáceos (Barnes, 1992). La familia Galatheidae (Orden Decapoda) está representada por más de 200 especies, cinco de éstas se encuentran en abundancia en los sistemas de corrientes de los bordes orientales del Océano Pacífico, incluyendo la langostilla *Pleuroncodes planipes* (Zeldis, 1985).

P. planipes se distribuye desde el sur de California, Estados Unidos de América, hasta el Golfo de Tehuantepec, México; incluyendo Bahía Magdalena en Baja California Sur, donde se le encuentra en mayores concentraciones (Gómez-Gutiérrez y Sánchez-Ortiz, 1995). En los estados larvales y juveniles son pelágicos, los adultos (figura1) del primer o segundo año de vida alternan entre el fondo y la superficie, asumiendo una vida estrictamente bentónica a partir del tercer año (Balart, 1996). Su alimentación es básicamente de materia orgánica particulada, algunos crustáceos planctónicos como anfípodos e isópodos y diatomeas bentónicas (Pérez-Flores y Auriolos-Gamboa, 1995).

Esta especie se encuentra regularmente en las redes destinadas a la pesca del atún y camarón, en toneladas que son desechadas. Cálculos conservadores estiman una abundancia de 735,929 Tm/año. Ecológicamente esta especie juega un papel preponderante en la trama alimenticia, pues se trata de un importante intermediario energético para especies de diversos ambientes (Sánchez, 2001). Esto ha llevado al estudio de su composición química con fines nutricionales en la acuicultura. En condiciones experimentales *P. planipes* es un excelente sustituto parcial en las dietas para camarones como *Penaeus californiensis* y

Litopenaeus vannamei, dado que mejora el crecimiento y la sobrevivencia de los organismos puesto que disminuye la susceptibilidad a enfermedades infecciosas, principalmente virales, que se ven favorecidas cuando estos organismos están expuestos a estrés por su explotación (Fernández, 1996; Goytortua, 1993, 2000; Sosa, 2002).

Los virus son los agentes infecciosos más comunes en el océano. Los crustáceos están expuestos a más de 30 enfermedades virales identificadas, incluidas en las familias Reoviridae, Picornaviridae, Parvoviridae, Togaviridae, Baculoviridae, Paramixoviridae, Rhabdoviridae e Iridoviridae (Sangamaheswaran y Jeyaseelan, 2001). La presencia de estos virus en crustáceos capturados en estado salvaje ha sido bien documentada (Chakraborty *et al.*, 2002). Sin embargo, no existen reportes que indiquen la infección de *P. planipes*, en condiciones naturales, por alguno de los agentes virales que tienen efectos negativos en camarones peneidos como: el IHNV (virus infeccioso hipodermal de necrosis hematopoyética), el virus TS (virus del síndrome taura), el YHV (virus de cabeza amarilla) y el WSSV (virus del síndrome de la mancha blanca) (Aguirre *et al.*, 2000).



Figura 1. Fotografía de *Pleuroncodes planipes*

I.2 LOS BACULOVIRUS.

I.2.1 El Virus de la Polihedrosis Nuclear de *Autographa californica* (AcNPV)

a) características del virus

Los baculovirus son virus envueltos con genoma no segmentado formado por una molécula circular de doble hebra de ADN. El genoma contiene de 80-180 kpb de longitud, con 154 marcos de lectura abiertos y los viriones pueden contener 20 o más polipéptidos. Están restringidos a un hospedero artrópodo de ecosistema terrestre o marino. La familia esta taxonómicamente dividida en dos géneros, *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) y *Granulovirus* (GV), distinguidos por la morfología de los cuerpos de oclusión que presentan. AcNPV pertenece a los NPV y deben su nombre a que producen una proteína denominada polihedrina con la cual forman estructuras llamadas cuerpos de oclusión (CO) que contienen uno o varios viriones en forma baciliforme (Miller, 1997).

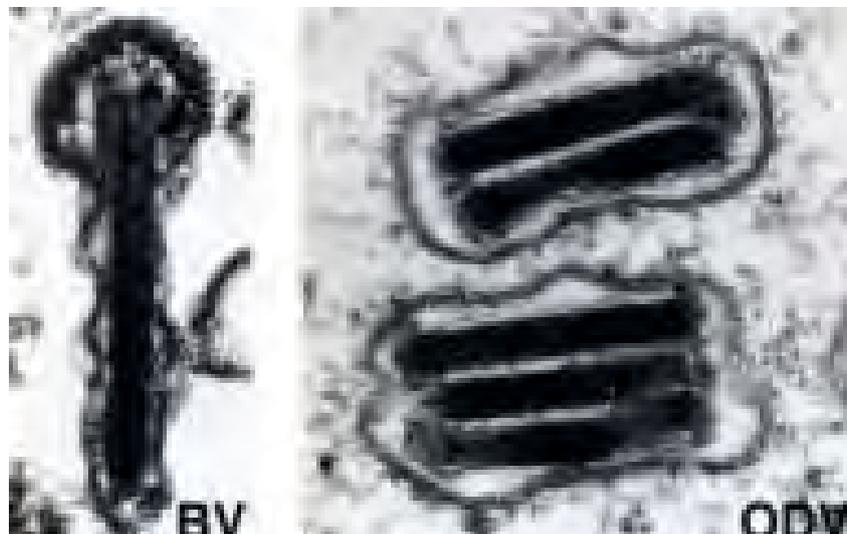


Figura 2.- Micrografía de microscopía electrónica de los viriones del AcNPV. BV= Virus que Brotó, ODV= Virus Derivados de Oclusión.

b) ciclo infectivo

La infección de este grupo inicia cuando la larva del insecto ingiere los COs y éstos se disuelven en el ambiente alcalino del intestino medio, liberando numerosos viriones denominados “virus derivados de oclusión” (ODV). Después de una fusión directa de ODVs con las células epiteliales del intestino medio, los viriones son descubiertos y transportados al núcleo, donde se dará la expresión genética, replicación del ADN y el ensamblado de la nucleocápside. Durante la infección, la principal glicoproteína de la envoltura, GP64, es sintetizada y transportada hacia la membrana (Monsma *et al.*, 1996). La recién ensamblada nucleocápside migra del núcleo hacia la membrana plasmática, para posteriormente emerger del lado basal de las células epiteliales al hemocele (cavidad sin revestimiento peritoneal), adquiriendo una envoltura de la membrana plasmática conteniendo la proteína GP64, que es requerida para un resurgimiento eficiente. Este segundo fenotipo viral es denominado “virus que brotó” (BV) y es considerado esencial para la infección sistémica, mediante el movimiento del virus por el intestino medio a otros tejidos y propagando la infección de célula a célula dentro del animal infectado. La infección célula-célula se lleva a cabo por endocitosis, después de que los BVs se adhieren a la membrana celular y entran en un endosoma, la acidificación de éste provoca la fusión de la GP64 y de la membrana endosomal, entonces las nucleocápsides son liberadas en el citoplasma y transportadas al núcleo donde ocurre la transcripción y replicación del ADN viral (figura 3) (Ijkel *et al.*, 2000).

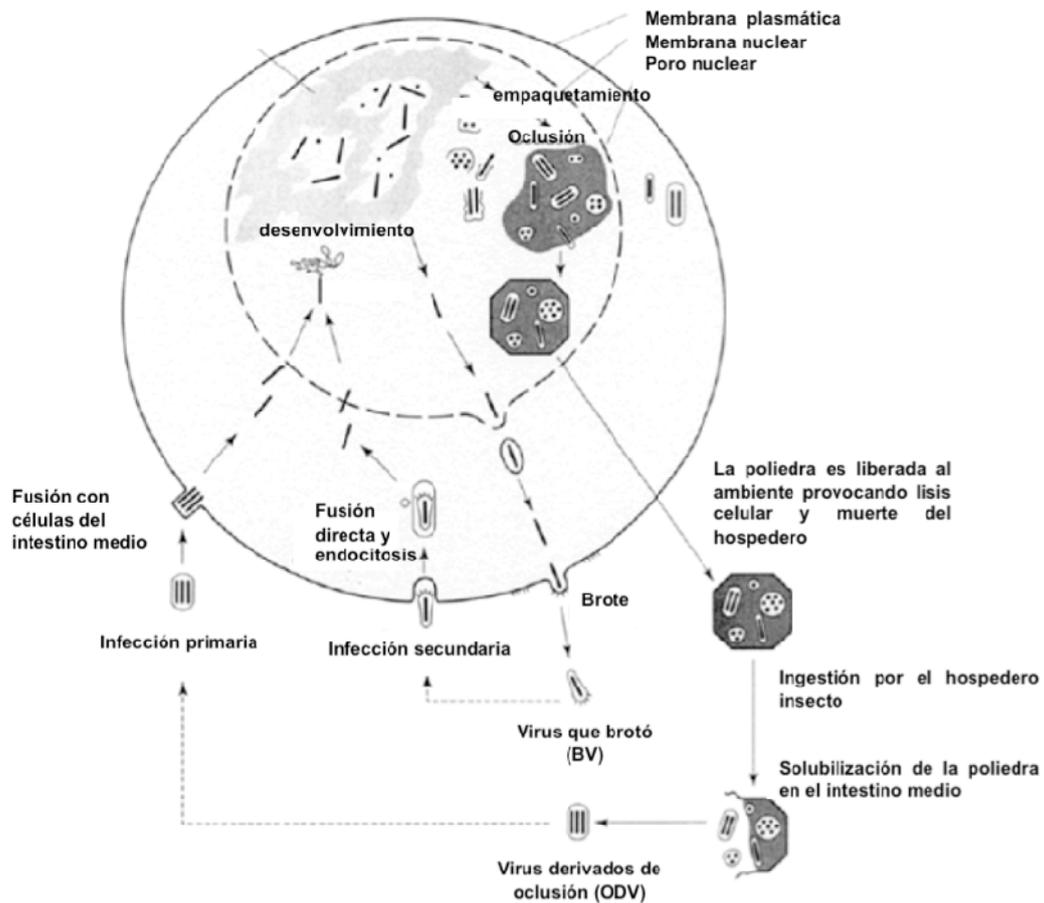


Figura 3.- Representación grafica del ciclo infeccioso del AcNPV.

I.2.2 Virus de la Mancha Blanca (WSSV).

Es el principal agente infeccioso que, desde su brote inicial en 1993 en Asia, ha causado pérdidas económicas millonarias en la acuicultura del camarón. Este virus no ocluido perteneció a la subfamilia de baculovirus no ocluidos Nudibaculoviridae (Francki *et al.*, 1991). Sin embargo, los baculovirus no ocluidos ya no pertenecen a la familia Baculoviridae (Murphy *et al.*, 1995) y el WSSV se reubicó en la familia Nimaviridae, siendo el único miembro y asignándole el género *Whispovirus* (figura 4) (Mayo, 2002). No obstante, la morfogénesis de los viriones, incluyendo la forma de vara de la nucleocápside del virus de la Mancha Blanca, son semejantes a las partículas virales de baculovirus, así

como la presencia de regiones repetidas dispersas en todo el ADN, una propiedad que comparte con los miembros de la familia Baculoviridae (Fauquet *et al.*, 2005).



Figura 4.- Micrografía del virión del WSSV. La línea representa 100 nm.

I.3 INMUNIDAD EN LOS CRUSTÁCEOS

A diferencia de los vertebrados, los invertebrados no producen anticuerpos específicos, por lo tanto, sólo dependen de la inmunidad innata para su protección contra virus y otros patógenos (Pan *et al.*, 2000). Esta inmunidad está constituida por barreras físicas, mecanismos humorales (complemento, lectinas, factores de coagulación y péptidos antimicrobianos), actividad celular desarrollada por hemocitos, como adhesión, fagocitosis, encapsulación y melanización; y los sistemas multiméricos como la coagulación y el sistema profenoloxidasa (Vargas-Albores, 1995).

I.3.1 La coagulación.

En artrópodos marinos, el exoesqueleto rígido de quitina es la barrera mecánica que, en primera instancia, impide el paso de patógenos al organismo. Cuando se produce una lesión reaccionan múltiples sistemas, entre ellos la coagulación. Ésta actúa básicamente

impidiendo la pérdida de hemolinfa a través de las heridas. En quelicerados la cascada de coagulación está compuesta por 5 proteínas: los zimógenos serin-proteasa C,B,G, la enzima pro-coaguladora y el coagulogeno. Los zimógenos C y G son los iniciadores de la cascada de coagulación, pues son altamente sensitivos a reconocer lipopolisacáridos (LPS) y β -1,3-glucanos, respectivamente. Sin embargo, algunos componentes de esta cascada se les ha identificado una doble función, las porciones amino terminal del zimógeno B y de la enzima pro-coaguladora contienen un pequeño dominio que tiene tres enlaces disulfuro llamados “dominio clip”; el patrón de plegamiento de estos dominios es idéntico al de las grandes defensinas, las cuales fueron identificadas como péptidos antimicrobianos en el cangrejo cacerola *Tachypleus tridentatus* (Saito *et al.*, 1995). En contraste, en los crustáceos el sistema de coagulación actúa por medio de una proteína coaguladora, la cual es un homodímero en el que los dos monómeros de alrededor de 200 kDa están unidos por puentes disulfuro. Esta proteína es catalizada por una transglutaminasa dependiente de calcio, que es liberada por los hemocitos después de una lesión (Theopold *et al.*, 2004).

I.3.2 El sistema profenoloxidasa

El sistema profenoloxidasa (proPO), está catalogado como un eficiente sistema de reconocimiento de lo no propio (Cerenius y Söderhäll, 2004; Lee y Söderhäll, 2001; Aspán *et al.*, 1991), es una cascada de proteasas compuesta de varios zimógenos, proPO y proteínas que reconocen patrones (PRPs), (LPS o peptidoglicanos de bacterias y β -1,3-glucanos de hongos), que participan en la formación de melanina, reacciones citotóxicas, adhesión celular, encapsulación y fagocitosis. (Iwanaga y Lee, 2005).

La proPO es una enzima bifuncional, la cual cataliza la hidroxilación de monofenoles a o-difenoles y la oxidación de o-difenoles a o-quinonas, las cuales polimerizaran, no enzimáticamente, a melanina. La producción de intermediarios tóxicos en la formación de o-quinonas por la fenoloxidasa (PO) es el paso inicial en la cascada bioquímica de la biosíntesis de melanina y es también importante en la esclerotización cuticular, cicatrización de las heridas y la encapsulación de materia extraño (Lee y Söderhall, 2002).

Las PRPs desencadenan la reacción del sistema proPO (figura 5). La proPO está presente como un zimógeno inactivo en la hemolinfa o en la cutícula y es convertida proteolíticamente en PO por una serin proteasa endógena, parecida a la tripsina, también llamada enzima activadora de la proPO (ppA). Esta contiene uno o dos dominios clip semejantes a los de las grandes defensinas del cangrejo cacerola (Lee and Söderhall, 2002). Wang y colaboradores (2001) reportaron que el péptido recombinante, correspondiente al domino clip del precursor de ppA (proppA) del langostino de río *Pacifastacus leniusculus* tiene una actividad antibacteriana parecida a la de la defensina, en contra de bacterias Gram positivas *in vitro*, sugiriendo que la activación de la proPO tiene una doble función (Iwanaga y Lee, 2005).

La activación del sistema proPO en *Pacifastacus leniusculus* promueve la actividad biológica de proteínas involucradas en la adhesión celular, como las peroxinectinas, las cuales tienen un dominio de peroxidasa y un motivo de unión a integrinas, característica necesaria para la adhesión celular. En 1999, Johansson y colaboradores aislaron peroxinectinas de la membrana celular de hemocitos de langostino de río, encontrando que contenían superóxido dismutasa extracelular, sugiriendo que la peroxinectina pudiera producir ácido hipohálico del peróxido de hidrógeno producido por la superóxido

dismutasa, funcionando como un eficiente sistema de ataque contra microorganismos invasores (Sritunyalucksana *et al.*, 2001).

La liberación de intermediarios tóxicos activos durante la producción de quinonas en lugares y tiempos inapropiados tendría consecuencias dañinas. Por ello, el sistema proPO se controla regulando la activación de la proenzima y la actividad de fenoloxidasa. En crustáceos se ha caracterizado un inhibidor eficiente de la ppA denominado pacifastina, el cual está compuesto de una cadena pesada con lóbulos de transferrina y una cadena ligera que es el inhibidor de proteasas (Liang *et al.*, 1997).

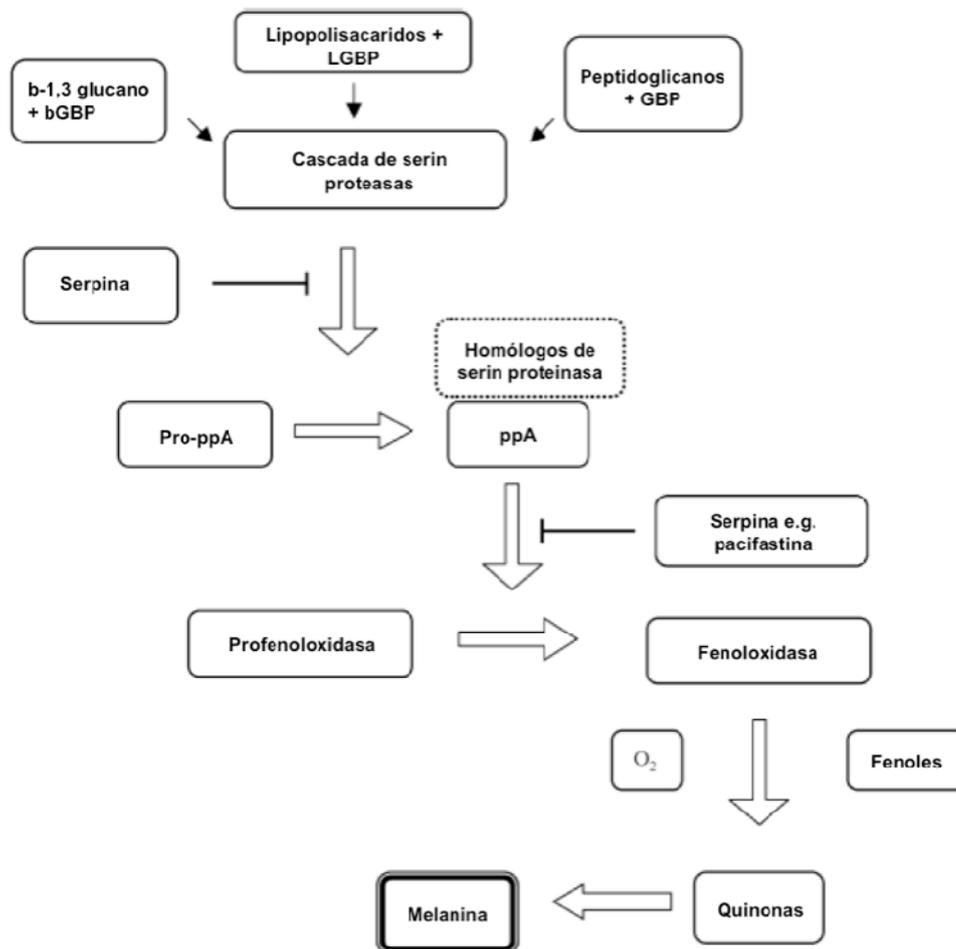


Figura 5.-Representación general de la cascada de la proPO.

I.3.3 Lectinas

Las lectinas son glicoproteínas que usualmente no tienen actividad catalítica y que tienen la propiedad de adherirse reversiblemente a carbohidratos específicos, expresados en la superficies celulares y por lo tanto llegan a inducir aglutinación de células (Zhao *et al.*, 2008) La interacción entre las lectinas y los carbohidratos está implicada en varias actividades biológicas, tales como transporte de carbohidratos, glicoproteínas y calcio en tejidos y células, adhesión celular, opsonización y formación de nódulos (Lee y Söderhall, 2002).

Debido a su habilidad de unirse específicamente a carbohidratos de superficie de microorganismos, las lectinas han sido consideradas como receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) en la inmunidad innata de animales (Zhao *et al.*, 2009). Se han identificado una gran variedad de lectinas en invertebrados, con diferentes funciones biológicas, dependiendo del tipo de unión y blancos (Vázquez *et al.*, 1998). Se han clasificado, en dos grupos: lectinas tipos C y S, en función de la secuencia de aminoácidos en el dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD), la organización total del dominio y propiedades fisicoquímicas como la dependencia a cationes divalentes y los requerimientos de tioles libres. La dependencia de calcio fue la principal propiedad asociada con las lectinas tipo C, mientras que la dependencia a tioles fue característica del tipo S (Marques y Barroco, 2000).

Las lectinas calcio-dependientes (tipo C) están compuestas por un CRD con dos o tres enlaces disulfuro, los cuales se cree median el reconocimiento de patógenos; están involucradas en la respuesta inmune innata, promoviendo la fagocitosis, formación de nódulos de encapsulación, melanización y la activación de la proPO. En los camarones peneidos se han caracterizado diversas lectinas tipo C; lectinas con un solo CRD de

Penaeus monodon, lectinas específicas de N-acetilglucosamina de *P. japonicus*, una lectina con dos CRDs en el hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei* y dos lectinas tipo C (Fclectina y Fc-hsL) en *Fenneropenaeus chinensis*.

Estas lectinas tipo C de camarones se unen a ligandos específicos de carbohidratos tales como N-acetilglucosamina y lipopolisacáridos, pueden aglutinar eritrocitos y muestran actividad antimicrobial en contra de algunos hongos y bacterias (Zhao *et al.*, 2009). Además se han detectado secuencias que codifican para lectinas tipo C en cADN de camarones infectados con WSSV (Luo *et al.*, 2003). Zhao y colaboradores (2009) reportan actividad antiviral de un péptido de la región de la lectina tipo C recombinante que se adhiere a manosas de *Litopenaeus vannamei*, mostrando una fuerte afinidad por varias proteínas de la envoltura del WSSV.

I.3.4 Péptidos Antimicrobianos

Se han caracterizado péptidos antimicrobianos que pueden atenuar o inhibir el crecimiento de patógenos (Destoumieux *et al.*, 2000). Estos péptidos se han reportado tanto en plantas como en animales.

En invertebrados, los péptidos antimicrobianos constituyen una línea de defensa importante y están definidos como moléculas de bajo peso molecular que responden inmediatamente a cualquier infección. La mayoría están constituidos por hélices alfa, hojas beta tipo pasador beta, hojas beta o estructuras mezcladas helices alfa/hojas beta, péptidos con una sobrerrepresentación de uno o dos aminoácidos y lipopéptidos (Bulet *et al.*, 2004; Ticum y Taylor, 2004). En el grupo de artrópodos marinos se han reportado algunos de estos péptidos. En los quelicerados, Nakamura y colaboradores (1988) aislaron, de hemocitos de *Tachypleus tridentatus* (cangrejo cacerola), un péptido denominado taquiplesina, que se

encuentra expresado constitutivamente y es liberado por exocitosis después de un contacto con endotoxina microbiana. Este péptido inhibe bacterias Gram positivas y negativas, provocando un rápido flujo de potasio, reduciendo así la viabilidad celular por la permeabilización de las membranas lipídicas. Por otro lado, reduce los efectos citopáticos del virus de la inmunodeficiencia humana en un 70% cuando es adicionado en el periodo de absorción del virus (Morimoto *et al.*, 1991) y mostró una ligera actividad antiviral en contra del virus de Influenza tipo A y del virus de la estomatitis vesicular, en periodos cortos y a temperatura controlada (Murakami *et al.*, 1991).

En crustáceos se han detectado péptidos antimicrobianos en cangrejos y camarones, los más prominentes son las peneidinas, que se aislaron de los hemocitos (células sanguíneas de invertebrados) del camarón *Penaeus vanamei*, las cuales inhiben la acción de hongos filamentosos y bacterias Gram positivas, pero no tiene actividad en contra de las levaduras (Destoumieux *et al.*, 2000).

I.3.5 Antivirales

Los esfuerzos por identificar moléculas antivirales en invertebrados marinos se han enfocado en crustáceos de importancia económica, tal es el caso de los camarones. Cuando éstos son infectados con virus, muchos genes se ven implicados en la interacción entre el hospedero y el virus. El estudio del perfil de la expresión de genes es importante en la identificación de aquellos que están involucrados en el sistema antiviral del camarón. Valiéndose de este principio, Wang y colaboradores (2006) identificaron, por medio de microarreglos, la regulación positiva de los genes implicados en el sistema inmunológico del camarón *Fenneropenaeus chinensis*, como los de las proteínas de choque térmico

(HSP70 y HSP90), la trehalosa-fosfato sintetasa (TPS) y la ubiquitina C cuando los camarones fueron retados con el WSSV.

Además, mediante un análisis de pequeñas secuencias de cADN expresadas en post larvas de camarón *Penaeus monodon* infectadas con WSSV, se ha detectado que la infección del virus modula algunos patrones de expresión de genes en varios órganos o tejidos, incluidos el hepatopáncreas, músculo y cutícula. Sugiriendo que varios procesos metabólicos celulares básicos son afectados, incluyendo la fosforilación oxidativa, la síntesis de proteínas, la vía glicolítica y el balance de iones calcio (Leu *et al.*, 2007). En la misma línea de investigación, Roux y colaboradores (2002) detectaron fragmentos de cADN codificantes para proteínas que se adhieren a lipopolisacaridos y β -1,3-glucano en camarones infectados con WSSV, e incluso refieren que existe un aumento en la regulación positiva de proPO al inicio de la infección, seguido de una disminución en el progreso de ésta, sugiriendo que la infección por WSSV regula la activación y/o actividad de la cascada proPO de una nueva manera.

Por otro lado, un importante inductor de la respuesta antiviral en muchos organismos es el ARN de doble hebra (dsARN), intermediario común durante el ciclo de replicación de muchos virus. En las células de vertebrados e invertebrados el dsARN intracelular detona una serie de mecanismos de silenciamiento de genes, conocidos como ARN de interferencia (iARN) esencialmente el iARN procesa al dsARN en pequeños ARNs (siARNs y miARNs) de 21-25pb de longitud, los cuales proveen secuencias específicas que inducen al complejo multiprotéico del silenciamiento del ARN, que actúa directamente en la degradación o la represión de la traducción del mRNA que comparte secuencias similares con el dsARN detonador (Robalino *et al.*, 2007). Este fenómeno, observado en el

camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, se detectó después de haber sido tratados con dsARN, pues mostraron un incremento en la resistencia a la infección por dos virus no relacionados, el WSSV y el virus del síndrome de Taura, demostrando que el sistema inmune del camarón puede reconocer a los dsARNs como un patrón de moléculas asociadas a virus que deriva en la activación de una respuesta antiviral innata (Robalino, *et al.*, 2004).

Pan y colaboradores (2000) demostraron la existencia de la actividad antiviral inespecífica en crustáceos, evaluando extractos tisulares del músculo del cangrejo azul (*Callinectes sapidus*), camarón (*Penaeus setiferus*) y langosta (*Procambarus clarkii*) en contra de una variedad de virus ADN y ARN. La caracterización del principal inhibidor en crustáceos indica un tamaño molecular de 440 kDa; este inhibidor es resistente a varias degradaciones químicas pero su actividad antiviral decrece por la extracción de lípidos con n-butanol (Pan *et al.*, 2000).

Sin embargo, la mayoría de los estudios se han enfocado a evaluar la respuesta en contra de bacterias y hongos, dejando de lado la defensa en contra de los virus. Además de que el progreso en tales investigaciones está muy limitado por la escasez de modelos virales y de líneas celulares de crustáceos para replicar y titular los virus, así como elaborar los ensayos de inhibición *in vitro* (Bachère *et al.*, 2000).

En un trabajo realizado previamente en nuestro grupo (Galvez, 2004) se identificaron dos grupos de moléculas, extraídas de *P. planipes*: uno formado por aquellas mayores de 50 kDa con actividad en contra de los virus influenza, parainfluenza y herpes; y otro grupo comprendido por moléculas menores de 50 kDa que mostró actividad acentuada contra baculovirus. Este último grupo resultó de interés debido a su especificidad, bajo peso molecular y a que inhibió al AcNPV, modelo de virus que pertenece a los baculovirus,

familia propia de invertebrados, emparentada con Nimaviridae que infecta a crustáceos marinos.

II. JUSTIFICACIÓN

La búsqueda e identificación de moléculas antivirales en crustáceos es fundamental pues básicamente la mayoría de los trabajos se avocan a la descripción de péptidos antimicóticos y antibacterianos. Además los estudios sobre las moléculas de defensa se han dirigido hacia la hemolinfa, sin considerar otras barreras de defensa como el exoesqueleto.

Por lo anterior, el identificar la/las moléculas con actividad antiviral encontradas en el extracto del exoesqueleto de *P. planipes* es la meta principal del trabajo.

III. HIPÓTESIS

La fracción con peso molecular <50 kDa. con actividad anti-baculovirus, obtenida de extractos del exoesqueleto de *P. planipes*, podría contener un péptido o proteína de bajo peso molecular con propiedades antivirales.

IV. OBJETIVOS

GENERAL: Identificar la molécula contenida en la fracción de <50 kDa obtenida de extractos del exoesqueleto de *P. planipes*, con actividad anti-baculovirus.

PARTICULARES

- Purificar la molécula inhibidora del baculovirus de la fracción <50 kDa.
- Evaluar el efecto de la molécula contenida en la fracción <50 kDa, como inhibidor del Baculovirus (modelo Ac NPV+GFP) *in vitro*.
- Secuenciar y comparar con una base de datos a la molécula inhibidora.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

V.1 Cultivo de células Sf9.

Las células Sf9 es una línea extraída del ovario de la larva de *Spodoptera frugiperda*. Se mantuvieron con medio SF900 II GIBCO SFM (# de catálogo 10902), suplementado con antibióticos-antimicóticos 1X y 5% de suero fetal bovino (SFB) inactivado cuando estaban en fase de crecimiento. Para los ensayos de inhibición se empleó el mismo medio sin SFB.

V.2 Producción del virus AcNPV+GFP.

Para el monitoreo de la actividad antiviral, se utilizó el virus de polihedrosis nuclear de *Autographa californica* el cual tiene insertado un gen reportero de la infección, el gen de la proteína verde fluorescente de medusa (AcNPV+GFP) en sustitución del gen de la polihedrina.

La propagación del virus se llevó a cabo infectando, con 5 ml de una dilución 10^{-1} , la línea celular Sf9 crecida, en monocapa previamente en medio SF900 en botellas de cultivo de 75 cm² con filtro a 27° C. Pasados 3-4 días se cosechó el virus dejando congelar la botella a -70° C por 24 h; posterior a ese tiempo se descongeló la botella en el cuarto frío (4° C), se clarificó centrifugando a 976 xg/15 min y se hicieron alícuotas de 200 y 300 µl y se procedió a titular el virus, congelando el resto de los viales a -70° C.

V.3 Titulación del AcNPV+GFP.

La titulación se llevó a cabo en una placa de 96 pozos previamente sembrada con 8×10^4 células Sf9 por pozo. Se hicieron diluciones dobles del virus AcNPV+GFP con el medio SF900 II sin suero (s/s), desde 1:2 hasta 1:128 agregando 100 µl/pozo por triplicado.

Finalmente, al tercer día se observó la placa en un microscopio invertido con luz UV (OLYMPUS) y se cuantificó por citometría de flujo (FACS Aria), para determinar la dilución a la cual se infectan el 50% de las células. Esta dilución corresponde a una MOI de $2^{9.4}$ la cual se empleó en los ensayos de inhibición de la infección por baculovirus.

V.4 Área de recolecta de *Pleuroncodes planipes*.

Las muestras de langostilla fueron obtenidas en el mes de mayo del 2002, en Bahía Magdalena (figura 6), localizada en la costa suroeste de la península de Baja California Sur. Latitud $25^{\circ}10'48''$ - $24^{\circ}26'24''$ Norte, Longitud $112^{\circ}11'24''$ - $111^{\circ}33'00''$ Oeste. Los organismos se recolectaron con la ayuda de una atarraya y una embarcación desde la cual se lanzó la atarraya en tres puntos escogidos al azar. Se separaron los exoesqueletos manualmente y se almacenaron a -70° C hasta su procesamiento.



Figura 6. Ubicación de Bahía Magdalena B.C.S. Área de recolecta de la langostilla *P. planipes*

V.5 Procesamiento de las muestras.

Mediante un homogenizador Janke and Kunkel (ultra-Turrax T25 S1, 600w, 24000 1/min) se molieron los exoesqueletos, con medio de cultivo RPMI 1640 Hybri-max (1 g/3 ml) y se centrifugó a 24,300 xg durante 15 min. Los sobrenadantes se filtraron a través de una membrana de 0.45 μm y 0.22 μm .

V.6 Inhibición de la infección del AcNPV+GFP en células de insecto Sf9.

Esta prueba consiste en evaluar si el extracto inhibe la infección del Baculovirus AcNPV+GFP en la línea celular Sf9 de insecto. Si el extracto inhibe la infección del virus se observa una disminución en el número de células fluorescentes con respecto al control positivo.

Para determinar el momento en que actúa la molécula inhibidora se realizaron los siguientes ensayos:

Experimento 1.- En un tubo tipo EPPENDORF 0.6 ml se incubaron 50 μl del virus con una dilución 1:16 (determinado por la titulación, ver resultados) con 50 μl de extracto (0.7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) durante una hora a 27° C. Posteriormente, la mezcla se puso en contacto con 8×10^4 células Sf9, crecidas previamente, por una hora a 27° C. Al término de este tiempo se sustituyó la mezcla por medio de cultivo dejando incubar por 3 días a 27° C (figura 7).

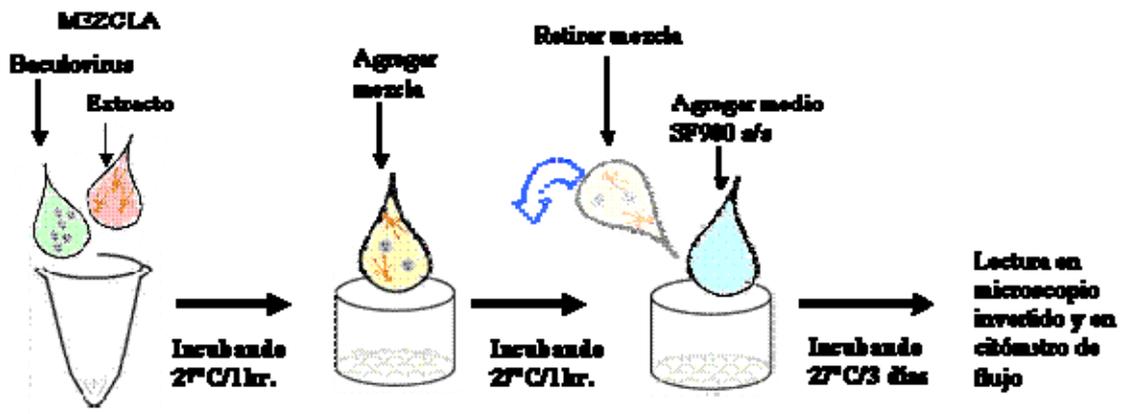


Figura 7. Esquema del experimento 1

Experimento 2.- Se incubaron 50 μ l de virus (dilución 1:16) en un pozo con 8×10^4 células Sf9, crecidas previamente, más 50 μ l de medio SF900 s/s por una hora a 27° C. Después se retiró el sobrenadante y se agregaron 50 μ l de extracto (0.7 μ g/ μ l) durante una hora a 27° C, al final el extracto se sustituyó con 100 μ l medio SF900 s/s y las células se incubaron por 3 días a 27° C (figura 8).

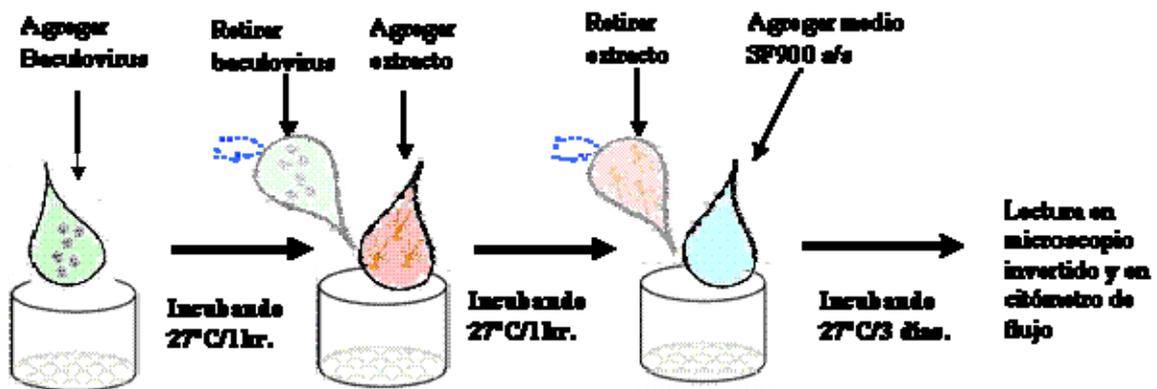


Figura 8. Esquema del experimento 2

Experimento 3.- Finalmente, se incubaron 50 μl del extracto (0.7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en un pozo con 8×10^4 células Sf9 en 50 μl de medio SF900 s/s por una hora a 27° C. Pasado este tiempo, se retiró el extracto y se agregaron 50 μl de virus (dilución 1:16) durante una hora a 27° C. Al cabo de este tiempo se retiró el virus y se agregaron 100 μl medio SF900 s/s para incubarlo por tres días a 27° C (figura 9).

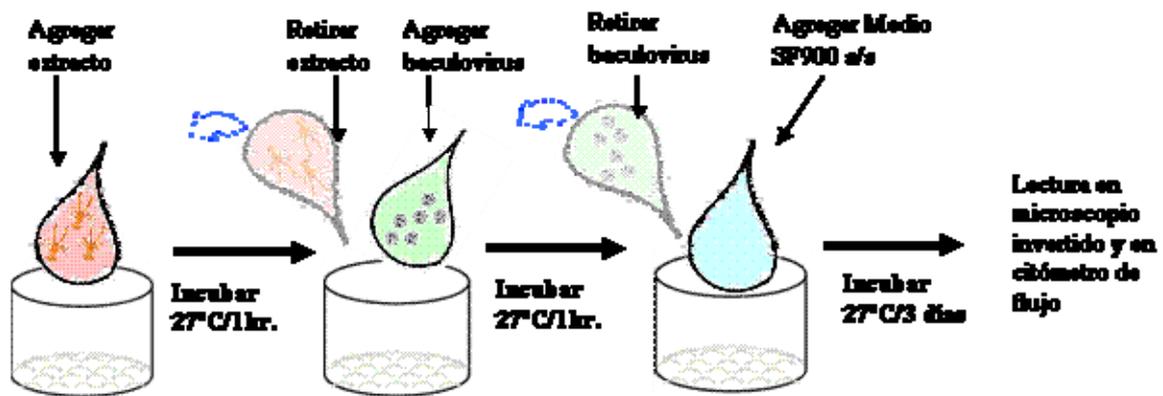


Figura 9. Esquema de experimento 3

Todos los ensayos anteriores se realizaron por triplicado con sus respectivos controles de virus (positivo) y de células, por duplicado. Finalmente, al tercer día se observaron los pozos en un microscopio invertido con luz UV (OLYMPUS) y la inhibición se determinó por la cuantificación del número de células fluorescentes en un citómetro de flujo (FACS Aria).

Una vez determinado el momento de acción del extracto, los ensayos con los productos más puros se realizaron del siguiente modo:

Se emplearon placas de 96 pozos con 8×10^4 células Sf9 por pozo y se agregaron 100 μl de la mezcla de los productos de purificación a una concentración de 0.7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y el virus (dilución 1:16), previamente incubados por una hora. Por otro lado, al control de células se

le agregaron 100 µl de medio de cultivo, mientras que al control de virus se le agregó 50 µl de virus (dilución 1:16) más 50 µl de medio s/s. La placa se incubó por 3 días a 27° C y posteriormente, se hizo el conteo de las células infectadas y no infectadas por medio de citometría de flujo (FACS Aria). Además se observó la placa en un microscopio invertido con luz UV (OLYMPUS).

V.7 Precipitación de proteínas con sulfato de amonio.

Se realizó una serie de precipitaciones con sulfato de amonio a diferentes porcentajes (40, 45 y 50 %). Se preparó una solución saturada de sulfato de amonio con un pH de 5.5. Por otro lado, se colocó un volumen inicial de 30 ml del extracto completo de exoesqueleto de langostilla en un vaso de precipitado, en agitación constante a 4° C, evitando la formación de burbujas. Después, se fue agregando la solución saturada de sulfato de amonio, lentamente, por goteo, durante media hora, según el volumen indicado en las tablas del Apéndice III de Segel (1976), para alcanzar un porcentaje de saturación de sulfato de amonio del 40%. Posteriormente, se dejó reposar por una hora a 4° C, pasado este tiempo la muestra se centrifugó a 10,800 xg por 10 min, obteniendo el sobrenadante, el precipitado fue resuspendido en la mitad del volumen inicial con PBS pH 7.2. Para las siguientes precipitaciones (45 y 50 %) se tomó al sobrenadante del porcentaje anterior como muestra inicial.

Todas las fracciones se dializaron contra PBS 1X pH 7.2, por 3 días en volúmenes de 1 L con cambios cada 12 h. Al final cada una de las fracciones se filtró con membranas de 0.22 µm en condiciones estériles para evaluar su actividad antiviral *in vitro*.

Se corrió un gel de poliacrilamida al 12.5 % en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), cargando 20 µl por muestra y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford. Finalmente se evaluó la actividad antiviral de cada una de las fracciones.

V.8 Tratamiento con calor de la fracción con mayor actividad antibaculovirus obtenida de la precipitación con sulfato de amonio.

La fracción de los precipitados con sulfato de amonio con la mayor actividad antiviral se calentó a 76° C por 30 min para desnaturizar las proteínas de mayor tamaño. La muestra se centrifugó a 13,400 xg, durante 10 min, se separó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en la mitad de volumen original, para evaluar la actividad antiviral de cada uno de ellos. Se corrió un gel de poliacrilamida al 15 % en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), cargando 20 µl por muestra y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford.

V.9 Separación con tubos Vivaspin® con corte de 30 kDa, de la fracción con mayor actividad antibaculovirus obtenida de la precipitación con sulfato de amonio

Para poder evaluar la actividad antiviral de las proteínas de mayor tamaño (que con el procedimiento anterior se desnaturizaron), se utilizó una nueva muestra de la fracción con mayor actividad antibaculovirus obtenida de la precipitación con sulfato de amonio para centrifugarla y en un tubo Vivaspin® con membrana de corte de 30 kDa a 4500 xg durante 45 min. La muestra se separó en dos fracciones, mayor de 30 y menor de 30 kDa, ambas fracciones fueron evaluadas para determinar su actividad antiviral.

A cada fracción se le determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford y se corrió un SDS-PAGE al 15%.

Del gel de acrilamida se extrajo la banda que tenía actividad antiviral para su secuenciación por espectrometría de masas en el laboratorio de péptidos y proteínas de la Facultad de Medicina, UNAM con el Dr. Guillermo Mendoza Hernández.

V.10 Efecto dosis-respuesta del péptido de *P.planipes* contra el AcNPV.

Se hicieron 10 diluciones dobles del péptido inhibidor (iniciando con 0.7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en volúmenes de 100 μl con medio SF900 II s/s, a las cuales se les agregaron 100 μl de baculovirus (dilución 1:16). Se incubaron por una hora y se agregaron a una placa con 8×10^4 células Sf9 por pozo sembrada previamente. La placa se incubó por una hora a 27° C, se retiró la mezcla extracto-virus y se agregaron 100 μl de medio de cultivo SF900 s/s, para posteriormente incubar durante 3 días a 27° C. El ensayo se realizó por triplicado y se leyó en un citómetro de flujo FACS Aria, para determinar la concentración del péptido que inhibe al máximo la infección por baculovirus.

V.11 Ensayo de citotoxicidad del péptido inhibidor de AcNPV

Se realizó una prueba de toxicidad haciendo 10 diluciones dobles del péptido inhibidor (iniciando con 0.7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) con medio de cultivo SF900 II s/s en volúmenes de 50 μl , se agregaron en una placa de 96 pozos previamente sembrada con 8×10^4 células Sf9, llevando a un volumen final de 100 μl por pozo con medio SF900 s/s. Se utilizaron 3 controles: uno de células viables (positivo), otro de células muertas (negativo) y un control de virus para

comparar la toxicidad de éste con el péptido. El ensayo se realizó por triplicado y se incubó por 3 días a 27° C, para posteriormente detectar la viabilidad de las células por medio de la reacción con MTT (Bromuro de tetrazolio 3-(3,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio) como se describe a continuación:

Pasados los tres días se quitó el sobrenadante de la placa y se agregaron 50 µl de medio SF900 s/s y 1 µl de MTT con una concentración de 5 g/L. Se dejó incubar por 2 h en agitación a 27° C, pasado este tiempo se centrifugó a 2000 xg durante 10 min.

Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se agregaron 50 µl de dimetilsulfoxido (DMSO) para solubilizar los cristales de sal magenta en agitación por 15 min. Después, se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de ELISA modelo MR5000 (DYNATEC) con el software BioLinx versión 2.22. Determinando así la concentración del péptido que es menos tóxica para las células Sf9.

VI. RESULTADOS.

VI.1 Producción del virus AcNPV+GFP.

Se obtuvo una producción del virus de 50 ml que se almacenaron en viales de 600 µl en volúmenes de 200 y 300 µl a -70° C para su posterior uso.

VI.2 Titulación del AcNPV+GFP

En los datos obtenidos del conteo de células por el citometría de flujo se observó que al incubar el virus con las células por tres días a 27° C, se alcanza una infección máxima del 67% en la dilución 1:4. En la dilución 1:16 se infecta el 50% de las células correspondiente

a una MOI de $2^{-9.4}$ que se utilizó para las pruebas de inhibición de la infección del baculovirus en las células Sf9 (figura 10).

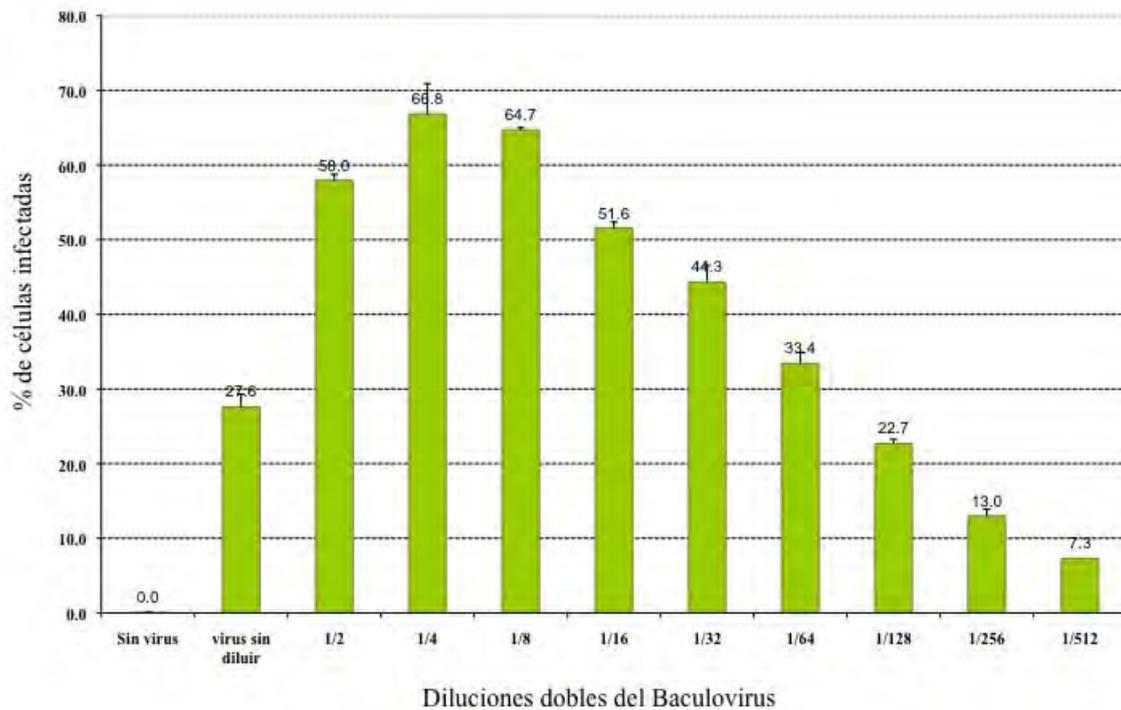


Figura 10. Titulación del AcNPV. Se observa el efecto de diferentes diluciones del virus en la infección de las células Sf9

VI.3 Procesamiento de las muestras

Se homogenizaron 20 g del exoesqueleto de langostilla en 60 ml de medio RPMI, obteniendo 55 ml de un sobrenadante clarificado y filtrado (extracto crudo), con una concentración de proteínas de $6.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ y con un perfil electroforético mostrado en la figura 11.

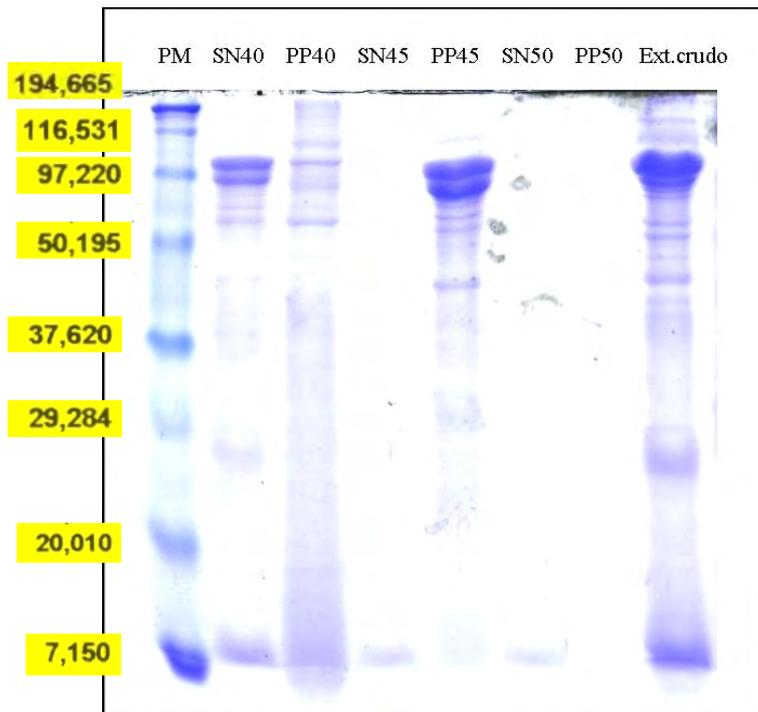


Figura 11. Gel de acrilamida al 12.5% de las muestras obtenidas del exoesqueleto de *P. planipes*. Los sobrenadantes y precipitados fueron obtenidos a diferentes porcentajes de saturación de sulfato de amonio. PM, Peso molecular; SN, sobrenadante; PP, precipitado y Ext, extracto crudo

VI.4 Determinación del momento en que actúa la molécula inhibidora.

En el experimento 1 (incubación previa del extracto con el virus), se observó una infección del 2.41% de la células, mientras que con la incubación previa del extracto con las células (experimento 2) hubo una infección del 27.4 %. Finalmente, en el experimento 3 (incubación previa del virus con las células) se observó la menor eficacia presentando una infección del 53.18 %, concluyendo así que la manera más eficiente de inhibición es cuando se incuba primero el extracto con el virus y después se agrega a las células (figura12).

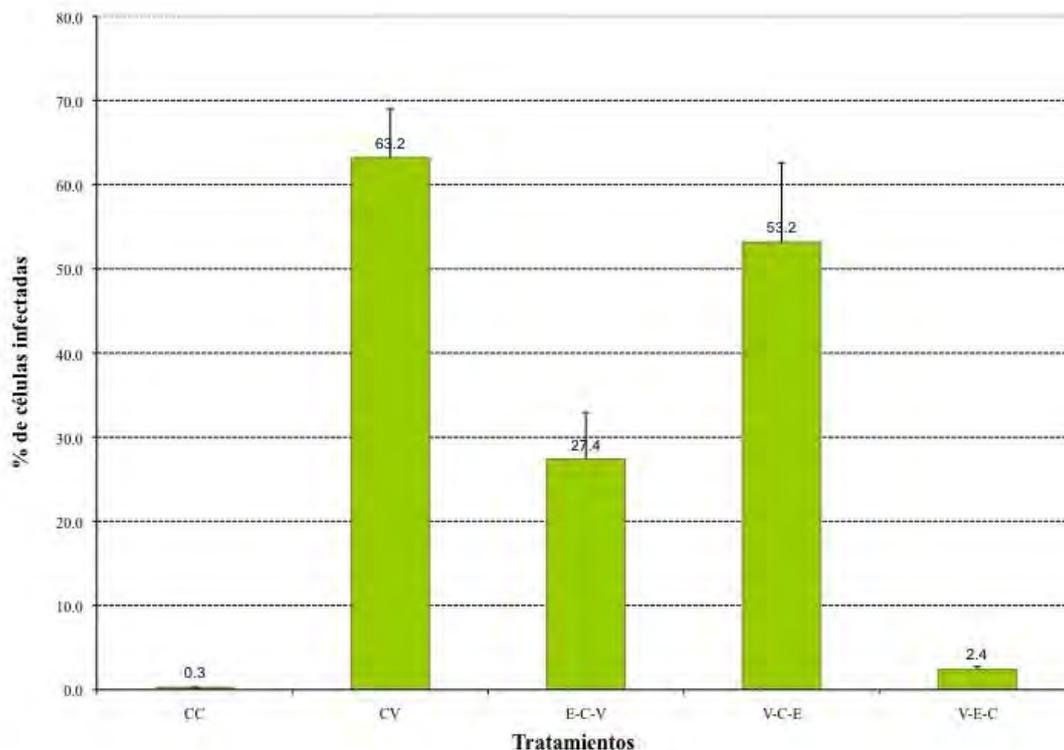


Figura 12. Determinación del momento de acción de la molécula inhibidora. Donde CC es el control de células, CV el control del virus, E-C-V= incubación extracto con células y finalmente virus, V-C-E= incubación virus con células y finalmente extracto y V-E-C= incubación virus con extracto y finalmente células.

VI.5 Precipitación de proteínas con sulfato de amonio.

En el experimento de separación del extracto total con diferentes porcentajes de saturación de sulfato de amonio (40, 45 y 50%), se obtuvieron un precipitado y un sobrenadante de cada porcentaje

En la figura 11 se observa que conforme se va aumentando la concentración de sulfato de amonio en las muestras se va eliminando los pesos moleculares altos, los cuales se van quedando en los precipitados. Mientras que en los sobrenadantes del 45 y 50% se pueden observar sólo bandas de bajo peso molecular, de aproximadamente de 10 kDa. Por otro lado, en el último precipitado (50%) ya no se visualiza banda alguna. En resumen, se

observa una tendencia en la cual los sobrenadantes conservan las moléculas de bajo peso y los precipitados las de alto peso en comparación con su respectivo porcentaje.

VI.6 Evaluación de las fracciones del extracto del exoesqueleto de *P. planipes* frente al AcNPV.

Todos los sobrenadantes (SN) y precipitados (PP) disminuyeron la infección del AcNPV (figura 13) Cuando se empleó el PP40 % se observó una disminución en el número de células infectadas (13.90%) en comparación con el control de virus, que tiene un porcentaje de células infectadas del 46.87 %. La fracción que mejor inhibió fue el SN40% con tan solo 0.47% de células infectadas, seguido por el SN45% (0.92%) y el SN50% (2.59%).

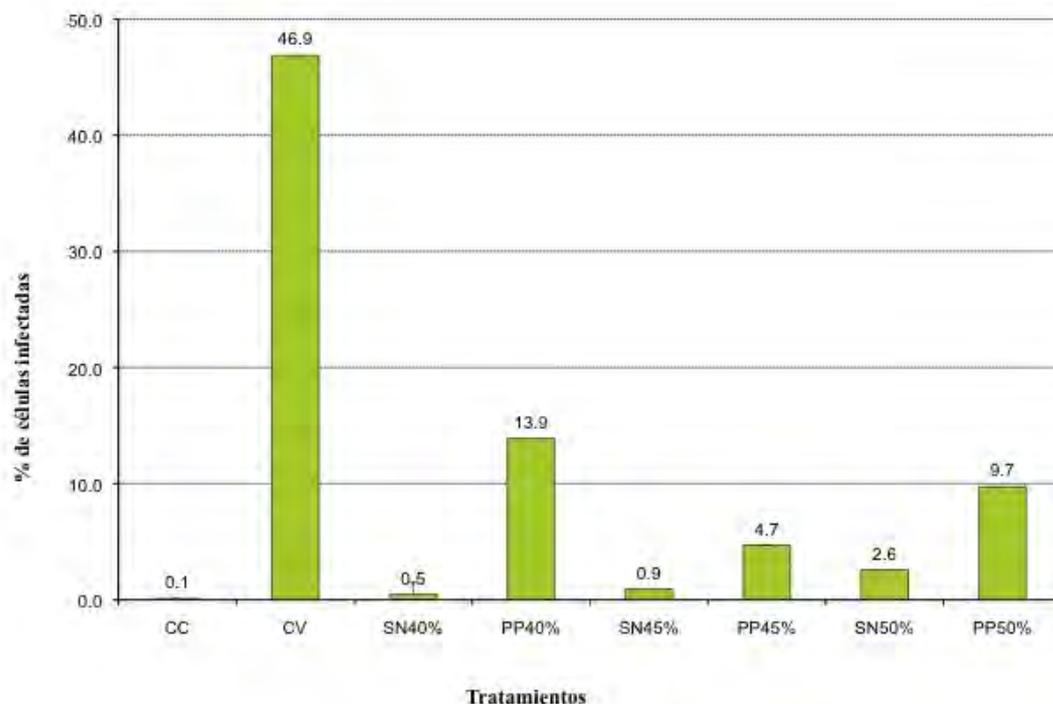


Figura 13. Inhibición del AcNPV por las fracciones resultantes de las precipitaciones con sulfato de amonio, SN40, PP40, SN45, PP45, SN50 y PP50 (tratamientos), CC=células sin virus ni tratamiento, CV=células con virus.

Para la purificación del péptido se tomó la determinación de trabajar con el SN50%, pues a pesar de que el porcentaje de infección es mayor que la del SN40%, la cantidad de bandas que muestra el SDS-PAGE 12.5% es menor. Y después de concentrar las muestras se observa una mayor cantidad de bandas en el SN 45%.

VI.7 Tratamiento con calor del SN 50%

Después de someter al SN 50% a una temperatura 76° C por 30 min, se centrifugó a 13,400 xg y se obtuvieron el sobrenadante (SN76) y el precipitado (PP76).

Al correr el SDS-PAGE 15% se observaron moléculas de bajo (alrededor de 10 kDa) y alto (alrededor de 110 kDa) peso molecular en el SN76 y PP76 respectivamente, como se muestra en el perfil electroforético de la figura 14 (a y b). Por otro lado, de la separación del SN50% con tubos Vivaspin® con una membrana de corte de 30 kDa. Se obtuvieron 2 fracciones mayor de 30kDa de la cual se obtuvo una molécula de aproximadamente 116 kDa (figura14c) y en la fracción de menor de 30 kDa, se observaron 2 bandas una de 116 kDa (figura14d) y la de 10 kDa (figura 13e).

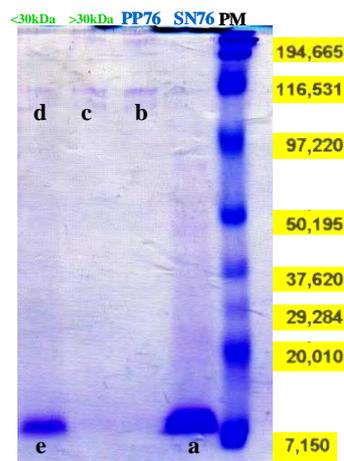


Figura 14. SDS-PAGE del precipitado (PP76) y sobrenadante (SN76) resultante de haber calentado la muestra a 76° C/30min. Y fracciones de >30kDa y <30kDa separadas por tubos VIVASPIN con membrana de corte de 30kDa

VI.8 Evaluación de la fracción del SN50% sometida a calor (76°C) frente al AcNPV.

Cuando se empleó el SN76 se encontró una infección del 0.5% en comparación con el 45.5% registrado en el control de virus y el 46.7% cuando se usa el PP76. (figura 15). Mostrando así que un péptido de bajo peso molecular y resistente al calor es el que conserva la actividad antibaculovirus.

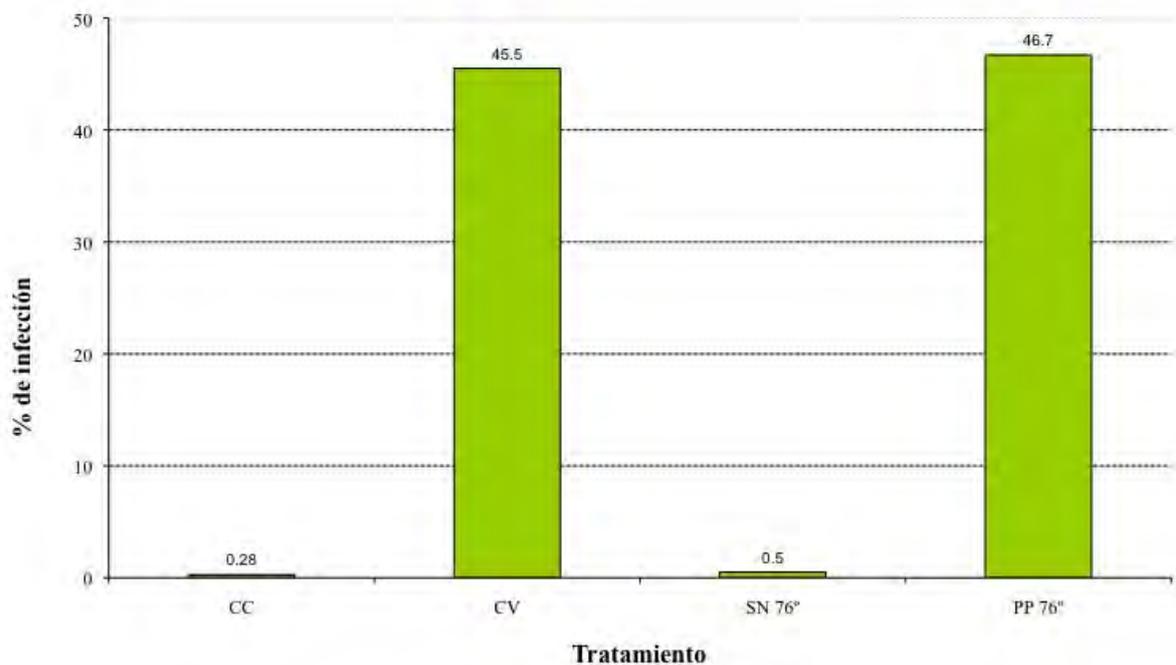


Figura 15. Inhibición de AcNPV por los productos del calentamiento del SN50 a 76° C.

VI.9 Evaluación de las fracciones obtenidas con tubos Vivaspín® con membrana de corte de 30 kDa contra el AcNPV.

Al probar la actividad antiviral de las fracciones <30 y >30 kDa, se observó que la primera fracción (<30 kDa) permitió una infección del virus de 2.8%, mientras que la segunda fracción (>30 kDa) se infectaron el 60.7% de las células (figura 16). Con lo que se comprueba que el inhibidor es un péptido de bajo peso molecular.

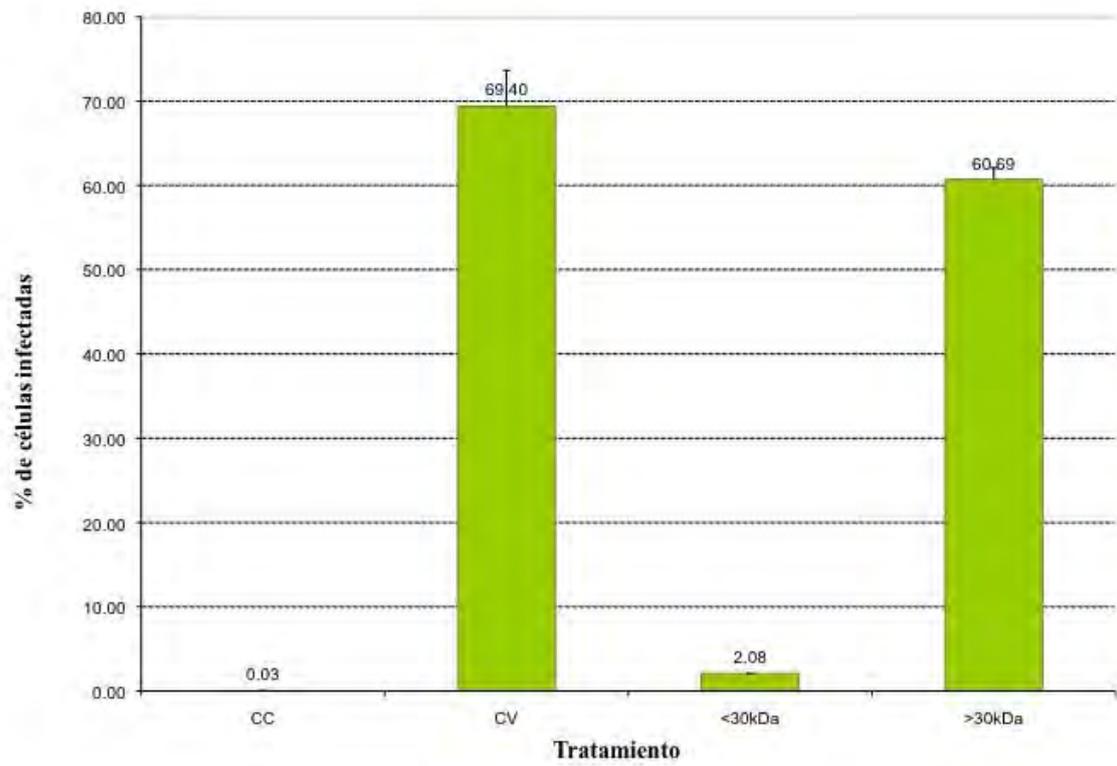


Figura 16. Inhibición del AcNPV por las fracciones <30 kDa y >30 kDa del SN 50%

VI.10 Efecto dosis-respuesta del péptido de *P.planipes* contra el AcNPV.

En la grafica que se muestra en la figura 17, se observa que la mejor concentración para inhibir al baculovirus AcNPV (MOI $2^{-9.4}$) fue de 0.7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Y que el efecto inhibitorio es dependiente de la cantidad de péptido disponible.

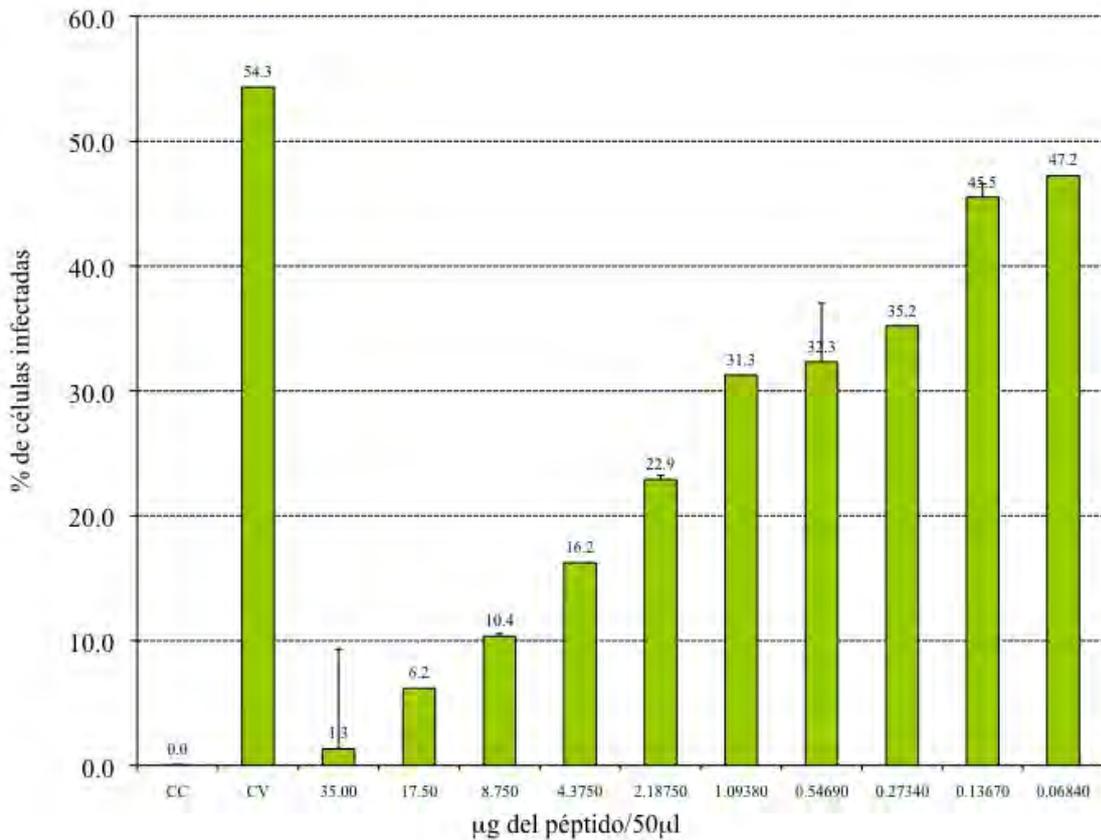


Figura 17. Gráfica de dosis-respuesta del la molécula inhibidora en diluciones dobles frente al baculovirus en dilución constante 1/16 que representa una MOI $2^{-9.4}$

VI.11 Ensayo de citotoxicidad del péptido inhibidor del AcNPV.

La figura 18 muestra la gráfica de los resultados obtenidos en el ensayo de MTT para conocer la citotoxicidad producida por el péptido de *P. planipes* en la línea celular Sf9. Se aprecia que ninguna de las concentraciones del péptido resultó ser tóxica a la línea celular, pues la viabilidad se mantiene cercana al 100%.

Es de notar que cuando se emplean 35µg del péptido la toxicidad producida es menor al 7% y es a esta concentración con la que se obtiene mayor inhibición del AcNPV

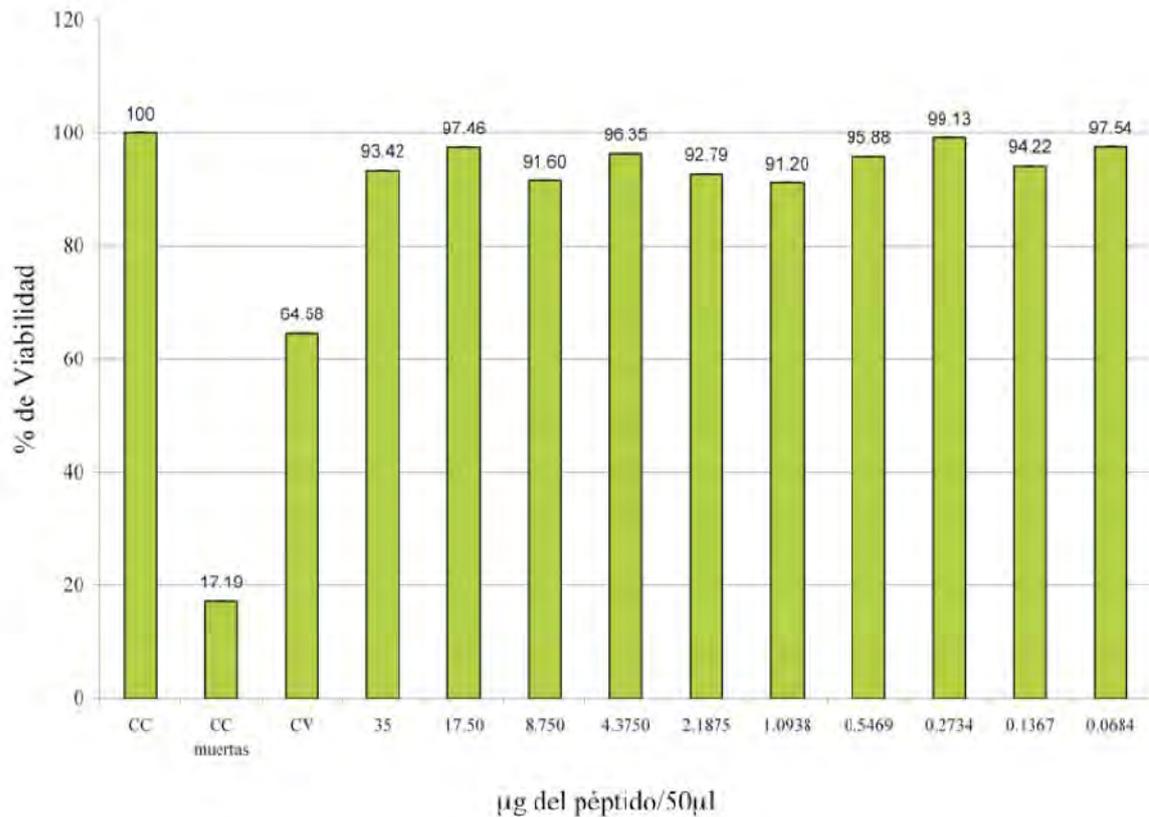


Figura 18. Porcentaje de células viables en donde CC= control de células, CC muertas= control de células lisadas con Triton IX, CV=control de virus

VI.12 Secuenciación de péptido antibaculovirus por espectrometría de masas

La secuencia obtenida por espectrometría de masas fue **VFYANLDEEHK** que se comparo con secuencias de la base de datos MASCOT (MATRIX SCIENCE) arrojando una similitud con una fracción de una proteína tipo miohemeritina del gusano anélido *Scoloplos armiger* con un puntaje de 73 (figura 19)

Protein View

Match to: gi|162849554 Score: 73
myohemerythrin-like protein [Scoloplos armiger]
Found in search of mas24.tmp

Nominal mass (M_r): 12111; Calculated pI value: 5.82
NCBI BLAST search of [gi|162849554](#) against nr
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Scoloplos armiger](#)

Variable modifications: Deamidated (NQ), Oxidation (M)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: 10%

Matched peptides shown in **Red**

```
1 EVPEPYVWDE SFKVFYANLD EHKGLFQGV FNVAGDKGSA DKLSALVAAV
51 DKHFKNEEGM MQAKSYADFP AHKQAHEAFL GRIKGLKAPV DDATVHFAKD
101 WLVNHIKGT
```

Show predicted peptides also

Sort Peptides By Residue Number Increasing Mass Decreasing Mass

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Sequence
14 - 24	682.8305	1363.6464	1362.6820	0.9644	0	K.VFYANLDEEHK.G Asn->Ile (N) [-0.96] (Ions score 77)
14 - 24	455.5833	1363.7280	1363.6408	0.0872	0	K.VFYANLDEEHK.G (Ions score 39)
14 - 24	455.7295	1364.1667	1363.6408	0.5259	0	K.VFYANLDEEHK.G (Ions score 53)

Figura 19. Reporte obtenido del análisis por espectrometría de masas del péptido antiviral obtenido de *P. planipes*

VII. DISCUSIÓN.

En este trabajo se purificó un péptido del exoesqueleto de la langostilla silvestre *Pleuroncodes planipes*, exhibiendo una clara actividad antiviral en contra del baculovirus AcNPV, ya que inhibió la infección en un 99.5% (ver figura 15). Este péptido de aproximadamente 10 kDa., es termoestable, puesto que conservó su actividad antiviral después de someterlo a 76° C durante 30 min y sin un aparente efecto citotóxico aún empleando una dosis de 0.7µg/µl (figura 15). A diferencia de lo reportado por Ertürk y colaboradores (2000) que al evaluar la actividad antibaculovirus de extractos de diversas familias vegetales, detectaron una baja toxicidad a una concentración de 0.074µg/µl en células Sf21.

El péptido obtenido de *P. planipes*, resultó tener una secuencia que, por espectrometría de masas, el análisis de iones dió como resultado una secuencia de aminoácidos, que empata con un fragmento de una proteína tipo miohemeritina (figura 19). Este resultado es similar al encontrado por Dhainaut y colaboradores (1989), en donde detectan un molécula de alrededor de 10 kDa con actividad antibacteriana, que además es similar a una proteína que une cadmio, una característica de las metaloproteínas tales como la hemeritina y la miohemeritina. La Miohemeritina es una proteína que contiene 118 residuos y está compuesta de cuatro paquetes α helicoidales con giro hacia la izquierda. Su centro activo contiene cinco histidinas, un ácido glutámico y un ácido aspártico, a los cuales, están unidos dos átomos de hierro. Un puente de ion oxido (O^{2-}) y un oxígeno completan la coordinación octaédrica de los átomos del hierro no-hemo (Takagi and Cox, 1991). Por lo anterior esta proteína participa en el almacenamiento de oxígeno en los músculos de

invertebrados marinos, relacionado principalmente con gusanos anélidos, como una proteína desintoxicante de metales pesados en oligoquetos y poliquetos (Deloffre, *et al.*, 2003).

Vergote y colaboradores (2004) detectaron actividad antibacteriana indirecta de la miohemeritina de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*, regulando la disponibilidad de hierro libre y privando a la bacteria del hierro esencial para su crecimiento. En el mismo sentido, Deloffre y colaboradores (2003) detectan esta actividad antimicrobiana en el gusano poliqueto *Nereis diversicolor* por parte de una hemeritina que captura hierro, evitando la adhesión del patógeno al tejido.

Así mismo, se ha reportado que la lactoferrina, metaloproteína presente en la mayoría de los fluidos biológicos de mamíferos, tiene un gran espectro antimicrobiano que depende de su estado “hierro-libre” y se atribuye comúnmente a su capacidad de ligar y secuestrar el hierro ambiental. Sin embargo, Ellison y colaboradores, (1988) indican que el mecanismo antimicrobiano de la lactoferrina es más complejo que la simple privación alimenticia del hierro, sus estudios con inmunofluorescencia han demostrado que la lactoferrina se une directamente a la superficie de varios microorganismos, sugiriendo que dañan la pared celular de las bacterias. Dicha metaloproteína, al igual que la miohemeritina, encajan en la descripción del grupo de péptidos/polipéptidos antimicrobianos con estructuras hélice- α , los cuales están ampliamente distribuidos en la mayoría de los organismos vivos, encontrándose entre los más abundantes y extensos de la naturaleza, y parecen presentar un arreglo estructural particularmente acertado en la defensa innata (Tossi, *et al.*, 2000). Estos péptidos son catiónicos y adoptan un comportamiento anfipático facilitando la interacción y

la inserción en paredes celulares aniónicas y membranas fosfolipídicas de microorganismos (Bulet, *et al.*, 2004).

La identificación de moléculas antivirales con características similares a los péptidos antimicrobianos anteriormente mencionados no ha pasado desapercibida. Baghian y colaboradores (1996) identificaron la acción antiviral en contra del virus *Herpes simplex I* de un péptido sintético antipático con hélice alfa, similar a los péptidos antimicrobianos como las cecropinas, magainas y melitina. El péptido inhibe la fusión celular inducida por el virus, disminuyendo la producción de proteínas virales que son esenciales en este proceso, inducido por las cepas MP y tsB5 del virus *Herpes simplex I*. Finalmente concluyen que la habilidad de embeberse eficientemente en la bicapa lipídica de las membranas celulares de este péptido y otros similares, alteran la fluidez de la membrana, provocando la inhibición de la fusión celular inducida por virus, así como la salida de nuevos viriones. De la misma forma Lombardi y colaboradores (1996) detectan actividad antiviral de péptidos sintéticos, que en condiciones hidrofóbicas, presentan una conformación de hélices alfa. Estos péptidos son similares a la proteína de superficie SU y transmembranal TM del virus de inmunodeficiencia felina y también sugieren que los péptidos interactúan con las moléculas de superficie de las células.

Por el contrario de estos estudios, nosotros creemos que el péptido extraído de *P. planipes* inhibe al baculovirus AcNPV uniéndose directamente a él, ya que el experimento en donde se incubó primero el extracto con el virus y posteriormente se agrega a las células mostró una inhibición del 96%, en comparación de los otros experimentos en los que se incubó: i) el virus con las células y posteriormente se agrega el extracto; o ii) extracto con las células

y después el virus, en los que se encontró una inhibición solamente del 15% y 56%, respectivamente (figura 12).

Se conoce que la principal proteína de adhesión del baculovirus AcNPV es la proteína GP64 esto se ha demostrado mediante el empleo de anticuerpos en contra de esta proteína mostrando una neutralización de la infección (Volkman *et al.*, 1984). La adhesión y fusión del virus con la membrana celular son procesos dependientes tanto de un pH bajo como de la proteína viral GP64 (Monsma *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997). También se ha reportado que la adhesión del virus y la fusión de la membrana son eventos que pueden ser mejorados por proteínas “enhancin”(facilitadoras de la infección) o factores cinérgicos producidos por el virus; algunas de estas proteínas “enhancin” han sido identificadas como metaloproteasas pues al ser expuestas con quelantes de iones metálicos, estas son inactivadas. Su modo de acción aun no ha sido bien determinado, pero se sugiere que actúan en las células epiteliales del intestino, degradando proteínas de la membrana peritrófica (Lepore *et al.*, 1996), dicha membrana impide que los alimentos entren en contacto directo con las células epiteliales y esta compuesta, entre otras proteínas, por quitina.

Estos datos nos revelan que posiblemente la membrana peritrófica este compuesta por metaloproteínas, como la miohemeritina, que impidan el paso de virus cuando entra por vía digestiva. Pues como sugiere Lepore y colaboradores (1996), uno de los facilitadores de la entrada del virus son estas metaloproteasas, que pueden estar evitando que la membrana del virus se enfrente a las metaloproteínas de la membrana peritrófica, que desestabilizan la membrana impidiendo la fusión de las proteínas virales con la membrana de la célula blanco, por presentar la función de péptidos anfipáticos con alfa hélice, como se mencionó antes.

Como se ha observado a lo largo de la discusión, la manera en como algunos organismos invertebrados lidian con patógenos ya sean bacterias, hongos o incluso virus tiene mucho que ver con la plasticidad de los péptidos, polipéptidos o proteínas que los conforman, pues al no contar con amplios genomas u proteomas se valen de una doble función que pueden desempeñar estas moléculas, tal es el caso del este péptido extraído del exoesqueleto de *P. planipes*, que demostró tener actividad antiviral en contra del baculovirus *AcNPV* y que resultó ser similar a la miohemeritina, la cual es un acarreador de oxígeno en los músculos. Consideramos que este hallazgo es el principal aporte que da este trabajo, puesto que se identifica un antiviral de características diferentes y de modo de acción no invasivo hacia las células que se pretenden proteger.

Por otro lado, el haber detectado este péptido antiviral en el exoesqueleto, que tradicionalmente ha sido identificado como protección mecánica pasiva, nos sugiere que también existen moléculas y mecanismos que participan activamente en la defensa inmune en este tejido. Además, se ha descrito la presencia de la miohemeritina en tejidos de la pared del cuerpo, en donde se incluye el exoesqueleto, del gusano poliqueto *Riftia pachytila*, que habita en las ventilas hidrotermales de los fondos oceánicos (Sánchez *et al.*, 2007).

Finalmente, el empleo de la langostilla *P. planipes*, como fuente de péptidos antivirales podría considerarse una ventaja en cuando a disponibilidad de tejido, ya que es un organismo que constituye un importante intermediario ecologico y además se le encuentra en altas densidades en las costas del pacífico mexicano (Sánchez, 2001).

Sin embargo, en la pesca del atún y camarón forma parte del 70% de la fauna de acompañamiento, es decir se considera un desecho. Sólo en algunos casos (Fernández, 1996; Goytortua, 1993, 2000; Sosa, 2002) se ha empleado experimentalmente como suplemento en las dietas de camarones, pues según García-Carreño (1992), el alto contenido de enzimas proteasas, realza su importancia como suplemento alimenticio ya que potencializa la digestibilidad. Por otro lado existen observaciones (Fernández, 1996) donde se afirma que disminuye las enfermedades en camarones peneidos cuando es empleado como suplemento alimenticio, desafortunadamente hasta ahora no existían reportes que soporten esta aseveración. No obstante en un trabajo previo realizado por nuestro grupo, se evidenció la existencia de actividad antiviral en fracciones de diversos pesos moleculares del extracto del músculo de la langostilla, en contra de diversas familias virales tales como: Orthomyxoviridae, Herpesviridae, Paramyxoviridae y Baculoviridae.

Se ha detectado la presencia de péptidos antivirales en especies comerciales que se cotizan en altos precios en el mercado de productos marinos, como el camarón, la langosta y el cangrejo, (Pan *et al.* 2000). Por lo que es una ventaja la búsqueda de péptidos antivirales en crustáceos que son considerados desecho, como *P. planipes*, pues además de la implicación económica, dichas especies son organismos que no han sido sometidos a presiones selectivas de cultivo, que pudieran provocar una alteración en el metabolismo proteico, con el fin de aprovechar características de importancia comercial y como consecuencia llevar paralelamente a la susceptibilidad a agentes patógenos importantes, como es el caso del virus de la mancha blanca, WSSV (Bachère, 2000).

Lo anterior puede evidenciarse con el hecho de que existen estudios en donde se retan camarones de cultivo con WSSV y se observa un aumento la expresión de genes que

codifican para algunas proteínas, están implicadas en la respuesta inmune (Roux, et al., 2002; Wang, et al., 2006; Leu, et al., 2007), a pesar de ello los camarones enferman y mueren, es decir, la capacidad de producir moléculas antivirales existe, no obstante la selectividad hacia mejorar el producto comercial promueve que la energía se dirija al crecimiento dejando de lado la síntesis de productos implicados en la defensa del organismo. A diferencia de lo que pasa en los crustáceos de vida silvestre que a pesar de portar el virus no presentan signos de la enfermedad (Chakraborty, et al., 2002).

VIII. CONCLUSIONES.

La molécula antiviral fue extraída del exoesqueleto del crustáceo decápodo *Pleuroncodes planipes* (langostilla).

Se identificó como una molécula de naturaleza protéica con actividad antiviral en contra del baculovirus *AcNPV*, de aproximadamente 10 kDa y termoestable.

El péptido antiviral inhibe de manera dosis dependiente al *AcNPV*, siendo la cantidad de 35µg suficientes para inhibir totalmente al virus *AcNPV* (MOI $2^{-9.4}$), sin ser tóxico a la línea celular Sf9.

La mejor inhibición (2.4% de células infectadas) se logró al incubar previamente el virus con el péptido durante una hora y posteriormente agregarlo al cultivo celular.

Se obtuvo una secuencia de aminoácidos (VFYANLDEEHK) que empata con una región de una proteína tipo-miohemeritina del gusano poliqueto *Scoloplos armiger*.

IX. PERSPECTIVAS.

Conocer la secuencia completa del péptido inhibidor de *AcNPV* mediante la secuenciación por degradación de EDMAN. Además, es de nuestro interés identificar el origen histológico específico, así como determinar la manera en que el péptido inhibe la infección por *AcNPV*. Por otro lado, queda por resolver la potencial actividad antiviral del péptido frente al *Nimavirus* de la mancha blanca *in vitro* e *in vivo*. Y finalmente, la identificación de las otras moléculas (de alto peso molecular) que inhiben los virus *Aujeszky*, *Influenza Aviar* y *LPM*, que se detectaron en un trabajo anterior.

X. BIBLIOGRAFIA.

- Aguirre, G.G. and V.F. Ascencio.** 2000. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. *Resent Res. Devl. Microbiology.* 4:333-348.
- Anderson K.V.** 1998. Pinning down positional information: dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell.* 95:439-442.
- Aspan A. and K. Söderhäll** 1991. Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells, and its activation by an endogenous serine proteinase. *Insect Biochem.* 21:363-373.
- Bachère E.** 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture.* 191: 3-11.
- Bachère E., Destoumieux D. and P. Bulet.** 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. *Aquaculture.* 191:71-88.
- Baghian A., Jaynes J., Enright F. and K.G. Kousoulas.** 1996. An amphipathic α -helical Synthetic Peptide Analogue of Melittin Inhibits Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1)-Induced Cell Fusion and Virus Spread Peptides. *18(2):* 177-183.

- Balart, E.F.** 1996. Recurso Langostilla. 167-180. *En:* Casas-Valdez, M. y G. Ponce-Díaz (eds.). Estudio del Potencial Pesquero y Acuícola de Baja California Sur. SEMERNAT, Gobierno del Estado de B.C.S., FAO, INP, UABCS, CIB, CICIMAR y CET del Mar.
- Barnes, R.D.** 1992. Zoología de invertebrados. Interamericana. México. 826 pp
- Baron, S., Singh I. P., Chopra A. K., Coppenhaver D. H., and J. Pan.** 2000. Innate antiviral defenses in body fluids and tissues. *Antiviral Research.* 48:71-89.
- Bulet P., Stöcklin R. And L. Menin.** 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological reviews.* 198: 169-184.
- Cerenius L. and K. Söderhäll.** 2004. The Prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews* 198: 116-126.
- Chakraborty, A., Otta S. K., Joseph B., Kumar S., Hossain Md. S., I. Karunasagar, Venugopal M. N. and I. Karunasagar.** 2002. Prevalence of white spot syndrome virus in wild crustaceans along the coast of India. *Current Science.* 11:1392-1397
- Deloffre L., Salzet B., Vieau D., Andries J.C. and M. Salzet.** 2003. Antibacterial properties of hemerythrin of sand worm *Nereis diversicolor*. *Neuroendocrinology Letters.* 24: 39-45.
- Destoumieux D., Muñoz M., Cosseau C., Rodríguez J., Bulet P., Comps M. and E. Bachère.** 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *Journal of Cell. Science.* 113:461-469
- Dhainaut, A., Raveillon B., M'béri M., Porchet-Henne E. and S. Demuynck.** 1989. Purification of an antibacterial protein in the coelomic fluid of *Nereis diversicolor*

(annelida, polychaeta). Similitude with a cadmium-binding protein. Comp. Biochem. Physiol. 94C(2): 555-560.

Ellison III, R.T., Giehl, T.J. and F.M. LaForce. 1988. Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. Infection and Immunity. 56(11) 2774-2781.

Engström Y., Kadalayil L., Sun S.C., Samakovlis C., Hultmark D. and I. Faye 1993. κ B-like motifs regulate the induction of immune genes in *Drosophila*. J Mol Biol. 232: 327-333.

Ertürk Ö., Demirbag Z. and A.O. Beldüz. 2000. Antiviral activity of some plant extracts on the replication of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus. Turk J. Biol. 24: 833-844.

Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U. and L.A. Ball. 2005. Virus Taxonomy. Elsevier Academic Press. USA. 2260 pp.

Fernández M.A. 1996. Evaluación de dieta con inclusión de harina de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) como fuente proteica. Efectos sobre la sobrevivencia y el crecimiento de juveniles de camarón café (*Penaeus californiensis*). Tesis Ingeniería. ITMAR-Guaymas-Extensión La Paz, Baja California Sur. México.

Francki R.I.B., Fauquet C.M., Knudson D.L. and F. Brown. 1991. Classification and nomenclature of viruses. Arch. Virol. Suppl. 12, 1-450.

Galvez R.G. 2004. Evaluación de la actividad antiviral de extractos tisulares del músculo de langostilla (*Pleuroncodes Planipes*). Tesis Biología Marina. UABCS. La Paz, Baja California Sur. Mexico.

- Gómez-Gutiérrez J. y C.A. Sánchez-Ortiz.** 1995. Centros de eclosión y deriva larval y poslarval de la langostilla *Pleuroncodes planipes* (Crustacea: Galatheidae), en la costa Occidental de Baja California Sur.35-57. *En:* Aurióles, G.D. y E. Balart (Eds.). La Langostilla: Biología, Ecología y aprovechamiento. CIBnor. México. 233 pp.
- Goytortua B.E.** 1993. Evaluación de la digestibilidad de dietas compuestas a base de harinas de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) y su efecto en el crecimiento en el camarón blanco (*Penaeus vannamei*). Tesis de Ingeniería. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. México.
- Goytortua B.E.** 2000. Evaluación del valor nutricional de un extracto lipídico y un concentrado proteínico de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) para el camarón blanco (*Penaeus vannamei*). Tesis de Maestría. Universidad de Colima. México.
- Ijkel F.J.W., Westenberg M., Goldbach W.R., Blissard W.G., Vlak M.J. and D. Zuidema.** 2000. A novel baculovirus envelope fusion protein with proprotein convertase cleavage site. *Virology.* 275, 30-41.
- Iwanaga S. and B.L. Lee.** 2005 Recent Advances in the Innate Immunity of Invertebrate Animals. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology.* 38(2) 128-150.
- Johansson M.W., Holmblad T., ThoÈrnqvist P-O., Cammarata M., Parrinello N. and K. Söderhäll.** 1999. A cell-surface superoxide dismutase is a binding protein for peroxinectin, a cell-adhesive peroxidase in crayfish. *J Cell Sci*;112: 917-25.
- Lee S.Y. and K. Söderhäll.** 2001. Characterization of a pattern recognition protein, a masquerade-like protein, in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *The Journal of Immunology.*166: 7319-7326.

- Lee S.Y. and K. Söderhäll.** 2002. Early events in crustacean innate immunity. *Fish and Shellfish Immunology*. 12. 421-437.
- Lepore L.S., Roelvink P.R. and R.R. Granados.** 1996. Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease. *Journal of Invertebrate Pathology* 68: 131–140
- Leu J.H., Chang C.C., Wu J.L. Hsu C.W., Hirono I., Aoki T., Juan H.F., Lo C.F., Kou H. and H.C. Huang.** 2007. Comparative analysis of differentially expressed genes in normal and white spot syndrome virus infected *Penaeus monodon*. *BMC Genomics*.8:120.
- Liang Z., Sottrup-Jensen L., Aspán A., Hall M. and K. Söderhäll.** 1997. Pacifastin, a novel 155-kDa heterodimeric proteinase inhibitor containing a unique transferrin chain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 6682–6687.
- Lombardi S., Massi C., Indino E., La Rosa C., Mazzetti P., Falcone M.L., Rovero P., Fissi A., Pieroni O., Bandecchi P., Esposito F., Tozzini F., Bendinelli M. and C. Garzelli.** 1996. Inhibition of Feline Immunodeficiency Virus Infection *in Vitro* by Envelope Glycoprotein Synthetic Peptides. *Virology*. 220: 274-284.
- Luo T., Zhang X., Shao Z. and X. Xu.** 2003. PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. *FEBS Letters* 551: 53-57
- Marques F.M.R. and M.A. Barroco.** 2000. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. *Aquaculture* 191:23-44
- Mayo M. A.** 2002. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch. Virol.* 147:1655–1656.
- Miller K.L.** 1997. *The Baculoviruses*. 1a ed. PLENUM Press. E.U.A. 447 pp.

- Monsma S.A., Oomens A.G. and G.W. Blissard.** 1996. The GP64 Envelope Fusion Protein Is an Essential Baculovirus. *Journal of Virology* . 70, 4607-4616.
- Morimoto M., Mori H., Otake T., Ueba N., Kunita N., Niwa M., Murakami T. and S. Iwanaga.** 1991. Inhibitory effect of tachyplesin I on the proliferation of human immunodeficiency virus in vitro. *Chemotherapy*. 37(3):206-11
- Murakami T., M. Niwa F. Tokunaga T. Miyata and S. Iwanaga.** 1991. Direct virus inactivation of tachyplesin I and its isopeptides from horseshoe crab hemocytes. *Chemotherapy*. 37(5):327-34
- Murphy F.A., Fauquet C.M., Mayo M.A., Jarvis A.W., Ghabrial S.A., Summers M.D., Martelli G.P. and D.H.L. Bishop.** 1995. Classification and Nomenclature of Viruses: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* Springer Verlag, Wien, New York.
- Nakamura T., Furunaka H., Miyata T., Tokunaga F., Muta T. and S. Iwanagall.** 1988. Tachyplesin, a Class of Antimicrobial Peptide from the Hemocytes of the Horseshoe Crab (*Tachyplesus tridentatus*). *The Journal of Biological Chemistry*. 263 (32):16709-16713
- Pan J., A. Kurosky B. Xu, A. K. Chopra D. H. Coppenhaver I. P. Singh and S. Baron.** 2000. Broad antiviral activity in tissues of crustaceans. *Antiviral Research*. 48:39-47.
- Pérez-Flores R. y D. Aurióles-Gamboa.** 1995 Hábitos alimentarios de la langostilla bentónica en la plataforma continental de la costa oeste de Baja California Sur. 125-137. *En: Aurióles, G.D. y E. Balart (Eds.). La Langostilla: Biología, Ecología y aprovechamiento.* CIBnor. México. 233 pp.

- Robalino J., Browdy C.L., Prior S., Metz A., Parnell P., Gross P. and G. Warr.** 2004. Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. *Journal of virology*. 78(19):10442-10448.
- Robalino J., Bartlett T.C., Chapman R.W., Gross P.S., Browdy C.L. and G.W. Warr.** 2007. Double-stranded RNA and antiviral immunity in marine shrimp: Inducible host mechanisms and evidence for the evolution of viral counter-responses. *Developmental and comparative immunology*. 31:539-547.
- Roux M.M., Pain A., Klimpel K.R. and A.K. Dhar.** 2002. The lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein gene is upregulated in white spot virus-infected shrimp (*Penaeus stylirostris*). *Journal of Virology*. 76(14):7140-7149.
- Saito T., Kawabata S., Shigenaga T., Takayenoki Y., Cho J., Nakajima H., Hirata M. and S. Iwanaga.** 1995. A Novel Big Defensin Identified in Horseshoe Crab Hemocytes: Isolation, Amino Acid Sequence, and Antibacterial Activity. *Journal of Biochemistry*. 117(5): 1131-1137
- Sánchez A.D.** 2001. Depredación diferencial sobre la Langostilla *Pleuroncodes planipes* (Crustacea: Galatheidae) por tres especies ícticas dominantes en los fondos de la costa oeste de Baja California Sur. Tesis de Licenciatura. Depto. de Biología Marina. Universidad Autónoma de Baja California Sur. México.
- Sanchez S., Hourdez S. and F.H. Lallier.** 2007. Identification of proteins involved in the functioning of *Riftia pachyptila* symbiosis by Subtractive Suppression Hybridization. *BMC Genomics*. 8:337.
- Sangamaheswaran A.P. and M.J.P. Jeyaseelan.** 2001. White Spot Viral Disease in Penaeid Shrimp. *Naga, The ICLARM Quarterly*. 24:16-22.

- Sosa G.A.** 2002. Evaluación nutricional de harina de langostilla (*Pleuroncodes planipes*), como ingrediente en dietas con diferentes niveles de proteína para *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora. México.
- Sritunyalucksana K., Wongsuebsantati K., Johansson M W and K. Söderhäll.** 2001. Peroxinectin, a cell adhesive protein associated with the proPO system from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Developmental and comparative immunology. 25 (5-6):353-63
- Takagil T. and J.A. Cox.** 1991. Primary structure of myohemerythrin from the annelid *Nereis diversicolor*. Federation of European Biochemical Societies. 285: (1) 25-27.
- Theopold U., Schmidt O., Söderhäll K. and M.S. Dushay.** 2004. Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. TRENDS in Immunology. 25(6) 289-294.
- Ticum A.J. and S.W. Taylor.** 2004. Antimicrobial Peptides from Marine Invertebrates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 48:10 3645-3654 pp.
- Tossi A., Sandri L. And A. Giangaspero.** 2000. Amphipathic, α -Helical antimicrobial peptides. Peptide Science. 55: 4-30.
- Vargas-Albores F.** 1995. The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*): Humoral recognition and cellular responses. Journal of Marine Biotechnology. 3:153-156.
- Vázquez L, Sierra C, Juárez S, Agundis C, Zavala A y E. Zenteno.** 1998. Mecanismos de inmunidad en crustáceos. Interciencia. 23:344-348.
- Vergote D., Sautière P-E, Vandenbulcke F., Vieau D., Mitta G., Macagno E.R. and M. Salzet.** 2004. Up-regulation of Neurohemerythrin Expression in the Central

- Nervous System of the Medicinal Leech, *Hirudo medicinalis*, following Septic Injury. The Journal of Biological Chemistry. 279 (42): 43828–43837.
- Volkman L. E., Goldsmith P. A., Hess R. T., and P. Faulkner.** 1984. Neutralization of budded *Autographa californica* NPV by a monoclonal antibody: Identification of the target antigen. Virology 133: 354-362.
- Wang P., Hammer D.A. and R.R. Granados.** 1997. Binding and fusion of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus to cultured insect cells. Journal of General Virology. 78: 3081–3089.
- Wang R., Lee, S. Y., Cerenius, L. and K. Söderhäll.** 2001. Properties of the prophenoloxidase activating enzyme of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. Eur. J. Biochem. 268: 895–902.
- Wang B., Li F., Dong B. Zhang X., Zhang C. and 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.
- Zhao Z.Y., Yin Z.X., Xu X.P., Weng S.P., Rao X.Y., Dai Z.X., Luo Y.W., Yang G, Li Z.S., Guan H.J., Li S.D., Chan S.M., Yu X.Q. and J.G. He.** 2009. A Novel C-Type Lectin from the Shrimp *Litopenaeus vannamei* Possesses Anti-White Spot Syndrome Virus Activity. Journal of Virology. 83(1): 347-356.
- Zeldis J.R.** 1985. Ecology of *Munida gregaria* (Decapoda, Anomura): Distribution and abundance, population dynamics and fisheries. Marine Ecology Progress Series. 22:77-99.