



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**BÚSQUEDA DE PÉPTIDOS Y/O PROTEÍNAS ANTIVIRALES EN EL LÍQUIDO  
CELÓMICO DEL ERIZO DE MAR, *TRIPNEUSTES DEPRESSUS***

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**MÓNICA SALAS ROJAS**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. JOSÉ ÁLVARO AGUILAR SETIÉN  
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: Dr. CÉSAR RAÚL GONZÁLEZ BONILLA  
FACULTAD DE MEDICINA

Dr. ENRIQUE ORTEGA SOTO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**MÉXICO, D.F. ENERO, 2014.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**BÚSQUEDA DE PÉPTIDOS Y/O PROTEÍNAS ANTIVIRALES EN EL LÍQUIDO  
CELÓMICO DEL ERIZO DE MAR, *TRIPNEUSTES DEPRESSUS***

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**MÓNICA SALAS ROJAS**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. JOSÉ ÁLVARO AGUILAR SETIÉN  
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: Dr. CÉSAR RAÚL GONZÁLEZ BONILLA  
FACULTAD DE MEDICINA

Dr. ENRIQUE ORTEGA SOTO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**MÉXICO, D.F. ENERO, 2014.**

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

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, en su sesión ordinaria del día 09 de septiembre de 2013, aprobó la ratificación del jurado que le fue asignado en la sesión del 13 de agosto de 2012 para la presentación de su examen para obtener el de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **SALAS ROJAS MÓNICA** con número de cuenta **93261465** con la tesis titulada **"BÚSQUEDA DE PÉPTIDOS Y/O PROTEÍNAS ANTIVIRALES EN EL LÍQUIDO CELÓMICO DEL ERIZO DE MAR, *Tripneustes depressus*"**, realizada bajo la dirección del **DR. JOSÉ ALVARO AGUILAR SETIEN:**

Presidente: DR. CUAUHTÉMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA  
Vocal: DR. EDGAR ARTURO ZENTENO GALINDO  
Secretario: DR. ROBERTO ALEJANDRO ARREGUIN ESPINOSA DE LOS MONTEROS  
Suplente: DR. CÉSAR RAÚL GONZÁLEZ BONILLA  
Suplente: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 16 de enero de 2014

*M. del Coro Ariz*

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

## AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, por la formación otorgada durante mis estudios

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada

Al Instituto Mexicano del Seguro Social, por el financiamiento otorgado para la  
realización del proyecto (FIS/IMSS/PROT/760)

A mi tutor el Dr. José Álvaro Aguilar Setién, por la dirección de este trabajo, los  
conocimientos compartidos, la paciencia recibida y sobretodo la confianza depositada  
durante todo el tiempo que hemos colaborado

Al Dr. César Raúl González Bonilla y al Dr. Enrique Ortega Soto, por aceptar ser parte  
mi Comité Tutor, así como compartir su experiencia, conocimientos y guiarme en la  
realización de este proyecto

## Agradecimientos

Al Dr. Cuauhtémoc Juan Humberto Lanz Mendoza, al Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo y al Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa de los Monteros por las aportaciones hechas a este trabajo

A mis compañeros del laboratorio: Memo, Hayde, Flor, Cirani, Martha y Leo, por su ayuda y compañía, pero sobre todo por la confianza, GRACIAS AMIGOS!!!!

A Giovanna y Vicky por su apoyo, amistad y compañía

A todos los miembros de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología, por su apoyo y compañerismo

A mis amigos: Luz, Mónica Villegas y Pedro por que siempre han estado a mi lado

A la Dra. Lourdes Romero, el Dr. Cornelio Sánchez, la Biol. Emma Lucia Espinosa y la Biol. Leticia Ramos, por ser un GRAN EJEMPLO durante mi formación académica

*Dedicada...*

*A mis padres, Ma. Enriqueta Rojas y Felipe Salas, por que  
ustedes me enseñaron las bases y las herramientas... y me dieron  
la libertad y confianza para todo este GRAN VIAJE*

*A mi esposo, Guillermo Galvez Romero, por tu paciencia y  
compañía, por que SIEMPRE me has dado tu apoyo y me has  
alentado para seguir adelante. A veces no hay palabras para  
expresar los sentimientos. TE AMO*

*A mis hermanos, Tania y Erik, por que me han acompañado y  
apoyado, pero sobretodo por que han hecho más divertido y  
ligero TODO*

*A mis otros papás, Ma. Inés Rojas y José Luis Arcos, por que  
siempre están presentes y son un gran ejemplo*

*A Giselle Arcos y Luis Alberto Arcos...HERMANOS*

## ÍNDICE

<b>Resumen</b>	<b>15</b>
<b>Abstract</b>	<b>16</b>
<b>Introducción</b>	<b>17</b>
<i>Generalidades del erizo de mar</i>	<b>17</b>
<i>Sistema inmune en erizos de mar</i>	<b>19</b>
<i>Virus Aujeszky</i>	<b>23</b>
<i>Virus de la rabia</i>	<b>27</b>
<b>Antecedentes</b>	<b>31</b>
<i>Antivirales</i>	<b>31</b>
<i>Invertebrados terrestres</i>	<b>32</b>
<i>Invertebrados marinos</i>	<b>34</b>
<b>Planteamiento del problema</b>	<b>36</b>
<b>Justificación</b>	<b>36</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>37</b>
<b>Objetivos</b>	<b>37</b>
<i>General</i>	<b>37</b>
<i>Particulares</i>	<b>37</b>
<b>Material y métodos</b>	<b>38</b>
<i>Área de recolecta y toma de líquido celómico</i>	<b>39</b>

<i>Inactivación por calor</i>	<b>40</b>
<i>Ensayo de citotoxicidad</i>	<b>40</b>
<i>SDS-PAGE y cuantificación de proteínas por Bradford</i>	<b>41</b>
<i>Análisis bioquímico</i>	<b>44</b>
<i>Ensayo de hemaglutinación</i>	<b>44</b>
<i>Células y virus</i>	<b>45</b>
<i>Ensayos de inhibición viral <u>in vitro</u></i>	<b>46</b>
<i>Curva dosis-respuesta</i>	<b>49</b>
<i>Determinación del momento del ciclo viral en el cual actúa el líquido celómico</i>	<b>49</b>
<i>Determinación del tipo de actividad (directa o indirecta)</i>	<b>50</b>
<i>Análisis estadístico</i>	<b>52</b>
<i>Separación de la fracción del LC con actividad antiviral</i>	<b>52</b>
<i>Precipitación con sulfato de amonio</i>	<b>52</b>
<i>Cromatografía de filtración molecular</i>	<b>53</b>
<b>Resultados</b>	<b>54</b>
<i>Análisis bioquímico, cuantificación de proteínas y visualización en SDS-PAGE</i>	<b>54</b>
<i>Ensayo de hemoaglutinación</i>	<b>57</b>
<i>Citotoxicidad del LC a las líneas celulares MDBK- y BHK-21</i>	<b>57</b>
<i>Actividad antiviral del líquido celómico en contra del virus Aujeszky y el virus de la rabia</i>	<b>58</b>

<i>Efecto de la temperatura sobre la actividad antiviral del líquido celómico</i>	<b>59</b>
<i>Determinación del momento del ciclo viral en el cual actúa el líquido celómico</i>	<b>61</b>
<i>¿El líquido celómico necesita estar presente en la solución o tiene un efecto tipo “inmunomodulador”?</i>	<b>63</b>
<i>Separación de la fracción del LC con actividad antiviral</i>	<b>64</b>
<i>Precipitación con sulfato de amonio</i>	<b>64</b>
<i>Cromatografía de filtración molecular</i>	<b>65</b>
<b>Discusión</b>	<b>67</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>72</b>
<b>Literatura citada</b>	<b>73</b>
<b>ANEXO</b>	<b>81</b>

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Esquema del erizo de mar	18
Tabla 1. Celomocitos en erizos de mar, función y proporción	20
Figura 2. Cuadro comparativo de las familias de PRRs en varios modelos animales	21
Figura 3. Esquema del virus Aujeszky	24
Figura 4. Esquema de replicación del virus Aujeszky	26
Figura 5. Esquema del virus de la rabia	27
Figura 6. Ciclo de replicación del virus de la rabia	29
Figura 7. Estrategia de trabajo	38
Figura 8. Mapa del sitio de recolecta	39
Tabla 2. Composición de los geles en SDS-PAGE	42
Tabla 3. Análisis bioquímico del LC	55
Figura 9. SDS-PAGE al 12.5% del LC de <i>Tripneustes depressus</i>	56
Tabla 4. Resultados de hemoaglutinación	57
Figura 10. Viabilidad de las líneas celulares (MDBK y BHK-21)	58
Figura 11. Efecto del LC del erizo de mar ( <i>T. depressus</i> ) en contra del virus Aujeszky y el virus del rabia	59
Figura 12. Fotografía de la inhibición de placas líticas del virus Aujeszky por el LC y los SNs y PPs de 56 y 72° C	60
Figura 13. Fotografías de la inhibición de focos fluorescentes del virus de la rabia por el LC y los SNs de 56 y 72° C	61

Figura 14. Efecto antiviral del los sobrenadantes y precipitados del LC expuesto al calor	<b>61</b>
Figura 15. Fotografía de la inhibición de placas líticas del virus Aujeszky según el momento de acción del LC	<b>62</b>
Figura 16. Momento de acción del LC en contra de los virus Aujeszky y de la rabia	<b>63</b>
Figura 17. Efecto antiviral del LC o del sobrenadante de células expuestas al LC	<b>64</b>
Figura 18. Inhibición obtenida con las fracciones de LC a distintas concentraciones de sulfato de amonio	<b>65</b>
Figura 19. Cromatogramas de la separación del LC por filtración molecular	<b>66</b>
Figura 20. SDS-PAGE al 12.5% de las fracciones del LC obtenidas por filtración molecular	<b>67</b>

## ABREVIATURAS

° C	grados Celsius
'	minutos
dL	decilitro
hrs	horas
L	litro
µg	microgramos
µl	microlitros
µm	micrómetros
µmol	micromol
M	molar
ml	mililitros
mA	miliamperes
mM	milimolar
nM	nanomolar
nm	nanómetros
Xg	gravedades
AcNPV	virus de la polihedrosis nuclear de <i>Autographa californica</i>
AMPs	péptidos antimicrobianos
APS	persulfato de amonio
Arg	arginina
ATCC	American Type Culture Collection
AZT	azidotimidina
BHK-21	baby hamster kidney fibroblast cells (línea celular)
BSA	albúmina sérica bovina
C3	proteína de complemento 3
CC	control de células
cel	células

CF	coelomic fluid
CT	control de toxicidad
CV	control de virus
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxiribonucleico
EST	etiqueta de secuencia expresada
GFP	proteína verde fluorescente de medusa
GMCSF	factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
GNBPs	proteínas de unión de nucleótidos de guanina
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HSP70	proteína de choque térmico 70
HzSNPV	virus de la polihedrosis nuclear de cápside sencilla de <i>Helicoverpa zea</i>
HSV	virus herpes simplex
IE	genes tempranos inmediatos
IFN	interferón
IL	interleucina
IPNV	virus de la necrosis pancreática infecciosa
IRS	secuencia de repetidos interna
kbp	kilo pares de bases
kDa	kiloDaltons
LC	líquido celómico
LC8	cadena ligera 8 de la dineína
leRNA	pequeñas secuencias líder de RNA
LPM	La Piedad, Michoacán
MCP	proteína quimioattractante de monocitos
MDBK	Madin Darby bovine kidney (línea celular)
mRNA	RNA mensajero
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

MWCO	molecular weight cut-off
nAchR	receptor nicotínico de acetilcolina
NCAM	molécula de adhesión neuronal
NK	Células asesinas naturales
NLRs	receptores de moléculas tipo NOD (con dominio de oligomerización que une nucleótidos)
OMS	Organización Mundial de la Salud
p75NTR	receptor de neurotrofina 75
PAMPs	patrones moleculares asociados a patógenos
PAGE	electroforesis en gel de acrilamida
pb	pares de bases
PBS	buffer de fosfatos
PGBP	proteínas que unen péptidoglicanos
PGRPs	proteínas que reconocen péptidoglicanos
PM	peso molecular
PP	precipitado
Pro	prolina
PRRs	receptores que reconocen patrones
PrV	virus de pseudorabia
PV	virus Pasteur
rEA	antígeno recombinante de <i>Eimeria sp.</i>
RLRs	receptores tipo RIG-I (gen 1 inducible por ácido retinoico)
RNA	ácido ribonucléico
RV	rabies virus / virus de la rabia
SDS	dodecilsulfato sódico
SFB	suero fetal bovino
SPSS	statistical packaged for the social sciences
SR	Suero de referencia
SRCR	receptores tipo “scavenger” con dominios ricos en cisteína

SHV-1	Suid Herpesvirus/ virus Aujeszky
SN	sobrenadante
SpC3	proteína de complemento 3 de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>
TEMED	tetrametiletilendiamina
TNF	factor de necrosis tumoral
TLRs	receptores de moléculas tipo Toll
TRS	secuencia de repetidos terminal
UFFs	unidades formadoras de focos fluorescentes
UFPs	unidades formadoras de placas
UI	unidades internacionales
U <sub>L</sub>	región única larga
U <sub>S</sub>	región única corta
UV	ultravioleta
V	virus
VHSV	virus de la septicemia hemorrágica viral
VIH	virus de inmunodeficiencia humana
VPX	proteína viral "x"
VSV	virus de estomatitis vesicular
WSSV	virus de síndrome de la mancha blanca

## Resumen

Varios estudios han reportado que moléculas aisladas de invertebrados tienen actividad en contra de diferentes virus, incluso en contra de aquellos que no los infectan de manera natural (virus de vertebrados). Uno de los principales mecanismos de defensa en los invertebrados es la síntesis de péptidos antimicrobianos (AMPs). El objetivo de este trabajo fue determinar si el líquido celómico (LC) del erizo de mar, *Tripneustes depressus*, tiene actividad en contra del virus Aujeszky y el virus de la rabia. Se realizaron ensayos de neutralización o inhibición de la infección para determinar la actividad antiviral. En contra del virus Aujeszky se encontró hasta un 50% de inhibición en la formación de placas líticas con al menos 33 µg de LC y en contra del virus de la rabia se encontró que 21 µg inhibieron hasta un 90% la infección de las células. La citotoxicidad del LC en las líneas celulares empleadas (MDBK y BHK-21) se eliminó inactivando con calor a 56 °C por 30' ó 72 °C por 20' (incluso cuando se usaron 50 µg de sobrenadante [SN o fracción termoestable] de LC "inactivado") y este SN conserva la actividad antiviral. En ambos casos el efecto antiviral fue directo (es decir, el LC necesita estar presente en la solución), termoestable (a 56 y 72 °C) y la mejor inhibición se encontró cuando el LC + el virus se incubaron antes de ser agregados a la células (neutralización). Con esto se concluye que el LC del erizo de mar, *Tripneustes depressus*, tiene actividad en contra del virus Aujeszky y el virus de la rabia, ésta es directa y termoestable hasta 72 °C y quizá esté actuando en las primeras etapas de la infección

## Abstract

Several studies have reported that molecules extracted from invertebrates have activity against different viruses, even against those that do not infect these organisms in their environment. One of the main mechanisms against pathogens in these organisms is the production of antimicrobial peptides. The objective of this study was to determine whether the coelomic fluid (CF) of the sea urchin *Tripneustes depressus* has activity against Suid herpesvirus type 1 and/or rabies virus. We tested the antiviral activity of CF in neutralizing assays and observed 50% inhibition against SHV-1 lytic plaque formation using 33 µg of CF, whereas 21 µg CF was sufficient to obtain more than 90% of inhibition for RV. Cytotoxicity to MDBK and BHK-21 cells was found with whole CF yet was eliminated by heating at 56 or 72 °C (even when using 50 µg of heat-inactivated CF supernatant [SN or thermostable fraction]), and SN conserved the antiviral effect. In both cases, the antiviral effect was direct and thermostable (SN 56 and 72 °C), and the best inhibition was observed when CF + virus was incubated prior to the addition of the cells (neutralization). Therefore, the coelomic fluid of *Tripneustes depressus* has antiviral activity against SHV-1 and RV that is direct and stable at 72 °C, and possibly this acting in the early stages of infection.

## **Introducción**

Los principales sistemas de defensa en invertebrados son: el de coagulación de hemolinfa, el de activación de la pro-fenoloxidasa, el complemento-lectina, el productor de reactantes de oxígeno, el de fagocitosis, la producción de RNA de interferencia y la producción de AMPs inducidos por moléculas tipo-Toll y PGBP (1). La síntesis de AMPs, es un componente vital del sistema inmune innato en la mayoría, si no es que en todos los organismos, actuando como efector inmune para eliminar o inhibir el crecimiento de sus blancos (2).

### *Generalidades del erizo de mar*

Los equinodermos son un grupo de invertebrados marinos que viven en el fondo del mar (bentónicos). En este grupo se encuentran a los lirios marinos (crinoideos), las estrellas de mar (asteroideos), los ofiuos (ofiuroideos), los pepinos de mar (holotutoideos) y los erizos marinos (equinoideos). Presentan una cavidad perivisceral o celoma perivisceral que está recubierto por un peritoneo ciliado (figura 1). Esta cavidad contiene al líquido celómico y en él se encuentran, entre otras cosas, las células fagocíticas denominadas celomocitos. En algunas especies de ofiuos y pepinos de mar los celomocitos pueden contener hemoglobina. El líquido celómico actúa como un sistema de transporte entre la pared del cuerpo y el tubo digestivo, facilita la distribución de los nutrientes, gases respiratorios y puede almacenar temporalmente los productos de desecho para ser excretados (3).

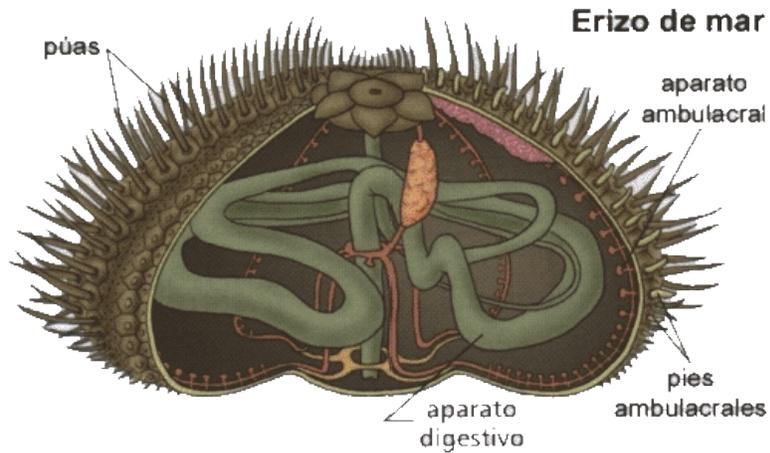


Figura 1. Esquema del erizo de mar, muestra la cavidad celómica en que se encuentran el aparato digestivo, sistema ambulacral y gónadas (a grandes rasgos) todos ellos embebidos por el líquido celómico. Imagen tomada de internet.

La ubicación taxonómica del erizo de mar, *Tripneustes depressus*, es la siguiente:

Phylum Echinodermata

Clase Echinoidea

Subclase Euechinoidea

Orden Temnopleuroida

Familia Toxopneustidae

Genero *Tripneustes*

Especie *T. depressus*

Se ha reportado su presencia en las costas del Golfo de California, así como en el Océano Pacífico cerca del Archipiélago de Revillagigedo (3).

### *Sistema inmune en erizos de mar*

Los celomocitos son las células del sistema inmune de los erizos de mar, se encuentran en la cavidad celómica en una mezcla de al menos 4 tipos distinguidos por su morfología: fagocitos, células con esférulas incoloras, células con esférulas rojas y células vibrátiles. Todos tienen la capacidad de reconocer y fagocitar bacterias y otras partículas extrañas, secretan compuestos antibacterianos y forman agregados celulares en respuesta a un daño o infección. La función reportada para estos tipos de células y su proporción en el LC de algunas especies de erizos de mar se muestra en la tabla 1. Estas células pueden expresar la proteína SpC3, que es semejante al C3 del complemento en vertebrados (ver más adelante) (4).

Los fagocitos son el grupo más abundante de los celomocitos y a su vez se pueden dividir en tres subtipos, dos basados en la arquitectura del citoesqueleto: a) células discoidales, las cuales presentan una forma de disco con los filamentos de actina orientados de manera radial y b) células poligonales, que generalmente son grandes y tienen los filamentos de actina orientados a lo largo de los ejes de una forma más angular. El tercer subtipo de fagocitos se denomina pequeños fagocitos, son células más pequeñas que las anteriores y presentan una morfología filopoidal (5). Las células discoidales y poligonales pueden pasar de una forma lamelipoidal a filipoidal y viceversa cuando se propagan ó en el procesos de coagulación dependiente de calcio, inducido por choque hipotónico ó un ionoforo de calcio (6).

Tabla 1. Celomocitos en los erizos de mar. Tipo celular, proporción y función. Basada en Smith *et al.* (6).

Tipo celular	% en el LC	Función
Fagocito • células discoidales • células poligonales • pequeños fagocitos	total <i>Sp</i> * 40-80% <i>Sd</i> 67% <i>Pl</i> 80%	Encapsulación, opsonización, rechazo al injerto, quimiotáxis, fagocitosis, actividad antibacterial, coagulación celular
Células con esférulas rojas	<i>Sp</i> 7-40% <i>Sd</i> 8% <i>Pl</i> 4.7%	Transporte de oxígeno, actividad antibacteriana del equinocromo A
Células con esférulas incoloras	<i>Sp</i> 3.7-25% <i>Sd</i> 6.5% <i>Pl</i> 7.8%	Citotoxicidad ¿Coagulación?
Células vibrátiles	<i>Sp</i> 11.9-20% <i>Sd</i> 18.5% <i>Pl</i> 7.5%	¿Movimiento o agitación del LC? Asociadas a la coagulación

\* *Sp*, *Strongylocentrotus purpuratus*; *Sd*, *Strongylocentrotus droebachiensis*; *Pl*, *Paracentrotus lividus*.

Entre el 4-5% de los genes identificados en el genoma del erizo de mar, *Strongylocentrotus purpuratus*, están relacionados directamente en las funciones del sistema inmune. Por su homología con genes descritos en otros phyla (por estudios basados en EST), se han determinado los genes modelo que pueden participar en el reconocimiento de PAMPs, encontrándose así: 222 genes que codifican para TLRs, 203 genes para NLRs y 218 genes para SRCR. Sin embargo, no en todos los casos se dio esta expansión de genes, ya que en lo que respecta a los PGRPs, los GNBPs y los RLRs, existe un número equivalente (5, 3 y 12, respectivamente) a lo que se reporta para los vertebrados (figura 2). Así, las secuencias del genoma del erizo de mar muestran adaptaciones que parecen ser únicas de este grupo; esto es, que la expansión en las familias de genes que codifican para receptores del sistema inmune innato es distinta a la descrita en cualquier otra especie caracterizada, no

sólo por el número de genes, sino también por los patrones de variación que presentan sugiriendo que su función es altamente específica (7).

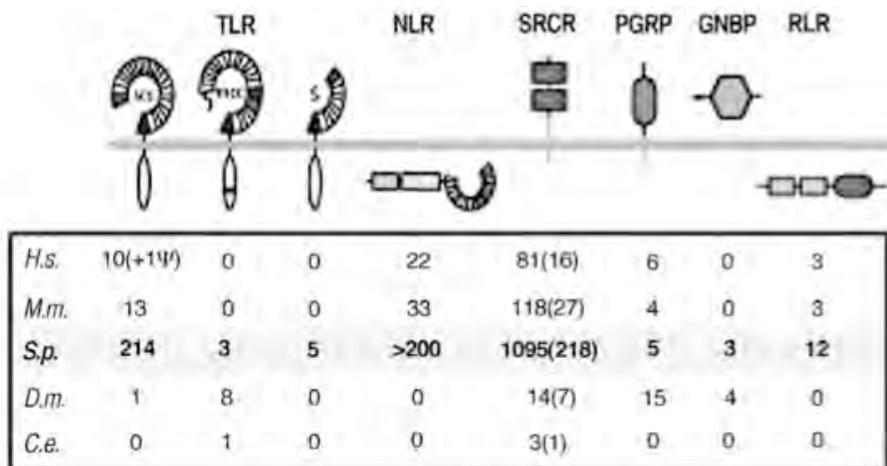


Figura 2. Cuadro comparativo de las familias de genes para los PRRs en varios modelos animales. *Strongylocentrotus purpuratus* (*S.p.*). *H.s.*, *Homo sapiens*; *M.m.*, *Mus musculus*; *D.s.*, *Drosophila melanogaster* y *C.e.*, *Caenorabditis elegans*. Para los SRCRs entre paréntesis se señala el número de dominios modelo. Figura tomada de Smith y colaboradores, 2010 (6)

En los celomocitos del erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus*, se encontró una proteína homóloga al componente C3 de complemento denominada SpC3. Esta proteína pesa 210 kDa, tiene dos cadenas, una  $\alpha$ -hélice de 130 kDa y una hoja- $\beta$  de 80 kDa. También presenta cisteínas en posiciones conservadas para formar puentes di-sulfuro, un sitio tioéster, también conservado, en la cadena  $\alpha$  con una histidina asociada, cinco sitios consenso de N-glicosilación y un sitio putativo de anclaje para el factor I y la C3 convertasa. El análisis filogenético muestra que SpC3 es la primera proteína que diverge en la base del clado de las proteínas de complemento (8).

Bertheussen en 1982 (9) reportó que la fagocitosis de los celomocitos del erizo de mar verde, *Strongylocentrotus droebachienses*, se incrementa significativamente cuando las células blanco (levaduras o eritrocitos) son opsonizadas con la molécula C3 de mamífero, lo que sugiere que los celomocitos tienen receptores para una molécula semejante a C3. La evidencia molecular de C3 en erizos, fue descrita en 1996 (10) y la secuencia completa de C3 y un homólogo del factor B se encontraron en 1998 (8, 11). En el 2004, Clow y colaboradores (12), demostraron que SpC3 funciona como una opsonina, promoviendo la fagocitosis de levaduras, bloqueando esta actividad cuando se aplica un anticuerpo específico (anti-SpC3) y observando por microscopia confocal que sólo un tipo de celomocitos es el que fagocita, los fagocitos poligonales; concluyendo así que SpC3 puede ser la principal opsonina humoral en el erizo de mar, *S. purpuratus*.

Existen diferentes estudios acerca del sistema inmune de los equinodermos y su respuesta en contra de bacterias y estímulos mecánicos (8, 12-17), pero la respuesta antiviral aún no ha sido bien estudiada, aún cuando el genoma completo del erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus* ya se secuenció (18).

De la respuesta antiviral en equinodermos se sabe que existen diez saponinas, nombradas certonardosidos A a la J, estas moléculas fueron aisladas del la estrella de mar, *Certonardoa semiregularis* y sus propiedades antivirales se probaron en contra de los virus VIH, Herpes simplex, virus Coxsachie B, virus de la encefalomiocarditis y el VSV; pero el mayor efecto se encontró sólo en los certinardosidos I y J (19).

## *Virus Aujeszky*

Este virus también es conocido como “pseudorabia” (PrV) o “Suid herpesvirus” (SHV) y pertenece a la familia Herpesviridae, subfamilia Alphaherpesvirinae, género *Varicellovirus*. El material genético del virus es DNA de doble cadena de aproximadamente 150 kpb, que pertenece a la clase D (subdivisión de los genomas dentro de los herpesvirus) que se caracteriza por tener dos regiones únicas, una larga ( $U_L$ ) y otra corta ( $U_S$ ), flanqueadas por dos secuencias de repetidos, una interna (IRS) y otra terminal (TRS). Éste genoma se encuentra rodeado de una cápside, un tegumento y la envoltura. Éste es un virus muy complejo en el cual se han identificado hasta 70 genes (figura 3) (20, 21).

La cápside de los alfa herpesvirus encierra y protege al genoma, esta consiste en 162 capsómeros de los cuales son 150 hexones (un hexon está formado por 6 moléculas de VP5 y 6 moléculas de VP26) y 12 pentones (11 de estos están formados por 5 moléculas de VP5 y un penton está formado por 12 moléculas de p(UL6) que forma el poro para introducir el nuevo DNA). Los hexones y los pentones se encuentran unidos por triplete (“triplexes”) formados por una molécula VP19C y dos moléculas de VP23, todo acomodado en un enrejado icosaédrico (figura 2) (20).

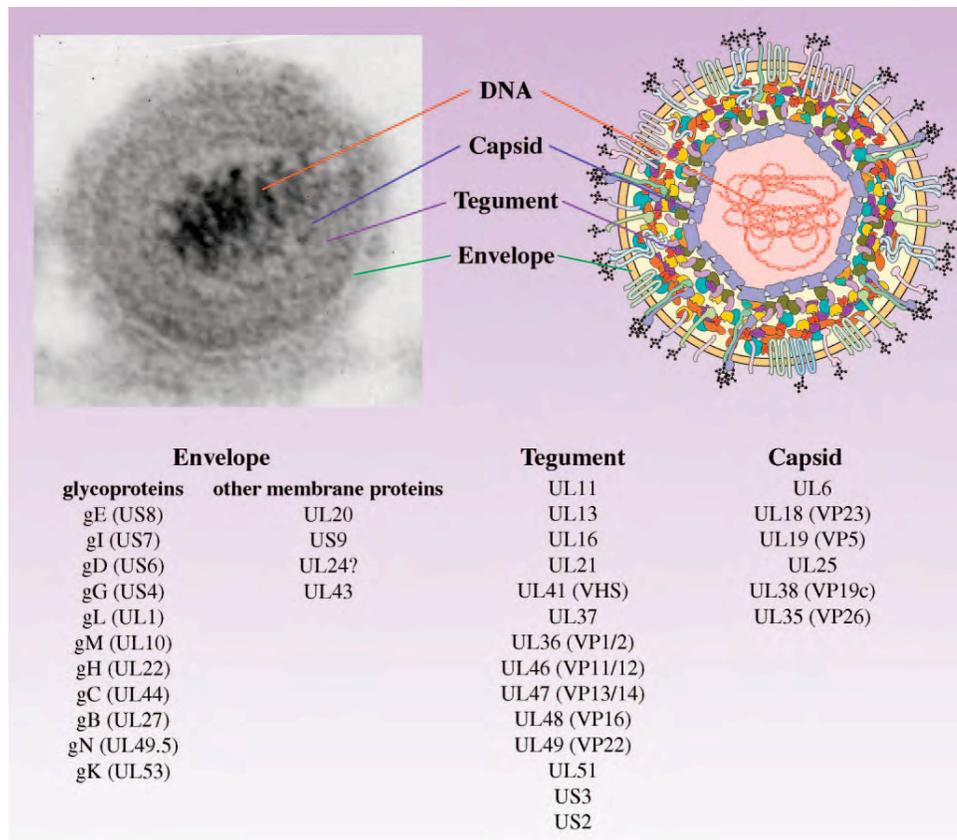


Figura 3. Virus Aujeszky. Microfotografía y esquema del virión en los que se señalan sus principales partes: DNA, cápside, tegumento y envoltura. Debajo se muestra en un listado los genes que lo conforman. Figura tomada de Pomeranz y colaboradores (21).

El espacio entre la cápside y la envoltura se encuentra ocupado por las proteínas del tegumento y actina celular; las proteínas del tegumento intervienen durante la entrada, el inicio de la replicación, el paso a través de la membrana nuclear interna y la envoltura secundaria en las vesículas del trans-Golgi. La envoltura es una bicapa fosfolipídica que se forma de las vesículas del trans-Golgi, ésta contiene 10 glicoproteínas (gB, gC, gD, gE, gH, gI, gK, gL, gM, gN) y al menos 2 proteínas no glicosiladas, p(UL43) y p(US9); todas estas

proteínas intervienen en la unión, internalización, formación de la nueva envoltura, egreso, diseminación celular, así como inducción y evasión de la respuesta inmune (20).

Ciclo de replicación. La adhesión del virus a la célula es iniciada por una unión poco estable entre la glicoproteína gC y el heparán sulfato expuesto en la membrana celular, para después formar una unión más fuerte con la glicoproteína gD que interactúa con al menos uno de sus tres receptores celulares: nectina 1, nectina 2 o CD55. Posteriormente, hay una fusión coordinada de gB, gD y gH/gL con sus contrapartes celulares que aún no han sido identificadas, así la cápside del virus es liberada al citoplasma y es transportada hasta el núcleo por los microtúbulos (figura 4) (20).

Una vez en el núcleo, durante las dos primeras horas se transcriben los genes tempranos inmediatos (IE), que para el virus Aujeszky el único IE es el IE180, éste activa no sólo promotores de genes virales sino también promotores de genes celulares. Después se activan los genes tempranos como EP0, UL54, UL48 (reguladores de la transcripción), UL23, UL39/UL40, UL50 (involucrados en la síntesis de nucleótidos), UI5, UL8, UL9, UL29, UL30, UL42, UL52 (implicados en la replicación del DNA). Finalmente, se expresan los genes tardíos los cuales codifican para proteínas estructurales, como las de la cápside, el tegumento y la envoltura; todas las proteínas de la cápside entran al núcleo para así formar la misma (figura 4) (20).

Lista la nucleocápside sale del núcleo envolviéndose en la membrana interna y desenvolviéndose en la membrana externa nuclear. En el citoplasma la nucleocápside es transportada hacia las vesículas del trans-Golgi para el proceso en el que adquiere una

envoltura secundaria. Para este paso no está bien claro que proteínas celulares intervienen, pero sí se sabe que las proteínas del tegumento US3, UL36 y UL37 (que en este momento se encuentran en la parte externa de la nucleocápside) son las que intervienen en el proceso de migración. Las glicoproteínas de la envoltura están ancladas a las membranas de la red del trans-Golgi con sus “colas” hacia el lado del citosol, ahí las proteínas del tegumento [P(UL11) y p(UL49)] las pueden reconocer y se ensamblan con las glicoproteínas gE y gM para formar el viri6n. Finalmente el virus es liberado por exocitosis (figura 4) (20).

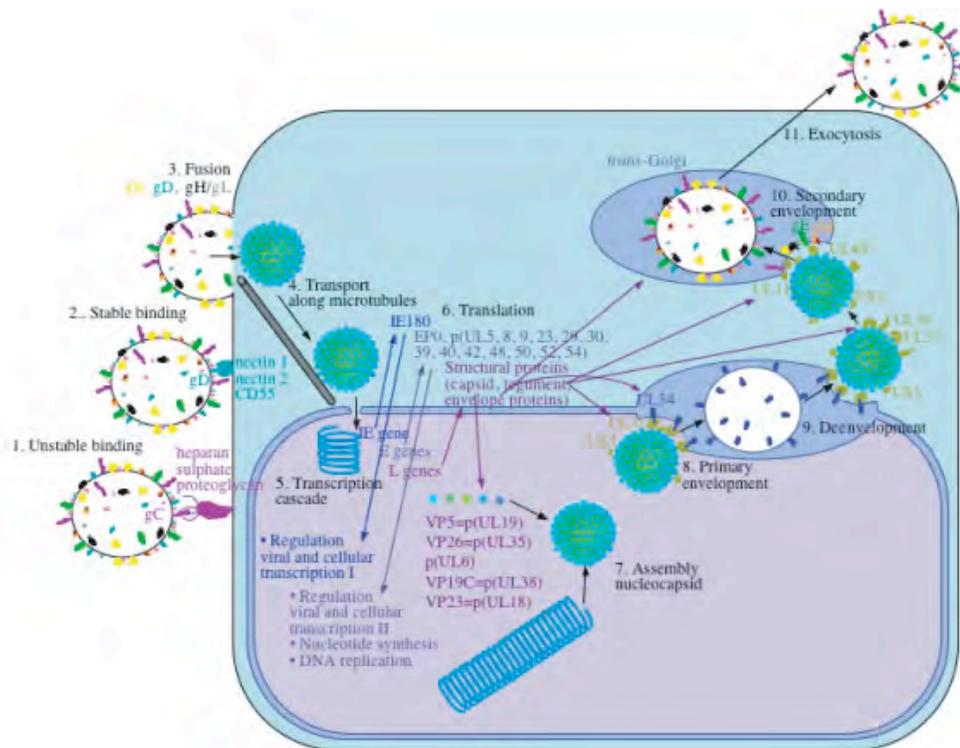


Figura 4. Esquema de replicación del virus Aujeszky. Tomado de Nauwynck y colaboradores (20).

## *Virus de la rabia*

Este virus pertenece al orden de los Mononegavirales, la familia Rhabdoviridae y al género *Lyssavirus*. Es un virus neurotrópico que mide 180 nm de longitud y 75 nm de diámetro y tiene forma de bala. Su genoma es un RNA lineal, no segmentado, de polaridad negativa, mide aproximadamente 12 kb y contiene 5 genes que codifican para las proteínas que los conforman (figura 5): la glicoproteína (70 kDa), la proteína de matriz (25 kDa) y el complejo de la nucleocápside que esta formado por el RNA viral unido a la nucleoproteína (57 kDa), la RNA polimerasa o proteína L (180 kDa) y la fosfoproteína (38.5 kDa) (22).

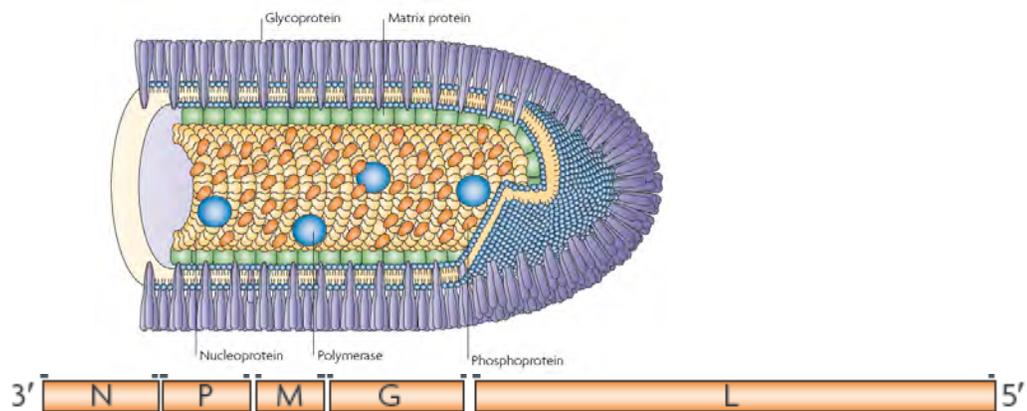


Figura 5. Esquema del virión y genoma del virus de la rabia. Los genes que codifican para las 5 proteínas del virus de correlacionan con el esquema del virus. Figura tomada de Schnell y colaboradores (23).

Ciclo de replicación. El ciclo de replicación del virus de la rabia se puede dividir en tres fases; la primera fase comprende la entrada del virus a su hospedero por unión a su receptor o receptores, el ingreso a la célula por endocitosis y la fusión de la membrana viral con la endosomal para liberar el genoma en el citoplasma celular (23). Se han

propuesto al menos tres posibles receptores para la glicoproteína del virus de la rabia (proteína G): el receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), la molécula de adhesión celular neuronal (NCAM) y el receptor de neurotrofina p75 (p75NTR), estas tres moléculas han sido las más estudiadas, pero también se han propuesto otras moléculas como gangliósidos, carbohidratos y lípidos que pueden actuar como receptores de entrada del virus (sobre todo en estudios *in vitro*), sin embargo su función no ha sido bien establecida (23, 24). El virus se internaliza a la célula por medio de vesículas cubiertas de clatrina y vesículas no cubiertas, posteriormente se ha detectado en los lisosomas. Se requiere de un cambio en el pH de la vesícula para que se puedan fusionar la membrana viral y la endosomal y así liberar la nucleocápside al citoplasma celular (23).

La segunda fase del ciclo del virus comprende la transcripción, replicación y síntesis de proteínas virales (figura 6); se han propuesto dos mecanismos para el transporte del virus hasta el cuerpo de la neurona, el primero se refiere al transporte sólo de la cápside viral, ya que se ha observado una interacción entre la fosfoproteína viral y la cadena ligera 8 de la dineína (LC8), sugiriendo que el virus usa el complejo motor de la dineína para el transporte intracelular. El otro mecanismo propone la idea del transporte del virus completo en vesículas, sin embargo no es claro como la vesícula se transporta hasta el cuerpo de la neurona (23).

La transcripción y replicación del genoma viral sucede en los cuerpos de Negri, los cuales contienen proteínas ubiquitinadas y la proteína de choque térmico 70 (HSP70), estos complejos tienen proteínas virales mal plegadas y son estructuras funcionales para la replicación del virus. La transcripción inicia en el extremo 3' de la cadena de RNA y dan

como resultado pequeñas secuencias líder (leRNA) no cubiertas (“uncapped”) y no poliadeniladas de 55-58 pb. El modelo de transcripción de los rabdovirus más aceptado es el denominado “alto-siga” (“stop-start model”), en el cual el complejo de la RNA polimerasa para la transcripción tiene una secuencia señal conservada, ignora la región intergénica (de 2-24 nucleótidos) y reinicia la transcripción en la siguiente señal de inicio; este proceso no siempre sucede entre cada gen por lo que la transcripción se va atenuando conforme se acerca al extremo 5’ del genoma. La nucleoproteína se une al leRNA con más fuerza a que a los otros RNA mensajeros, por lo que se propone que esta región contiene la señal de encapsidación y que cuando hay suficiente proteína N en el citoplasma y se une al leRNA el resultado es la síntesis de un genoma completo de sentido negativo, cambiando así el proceso de transcripción a replicación (23).

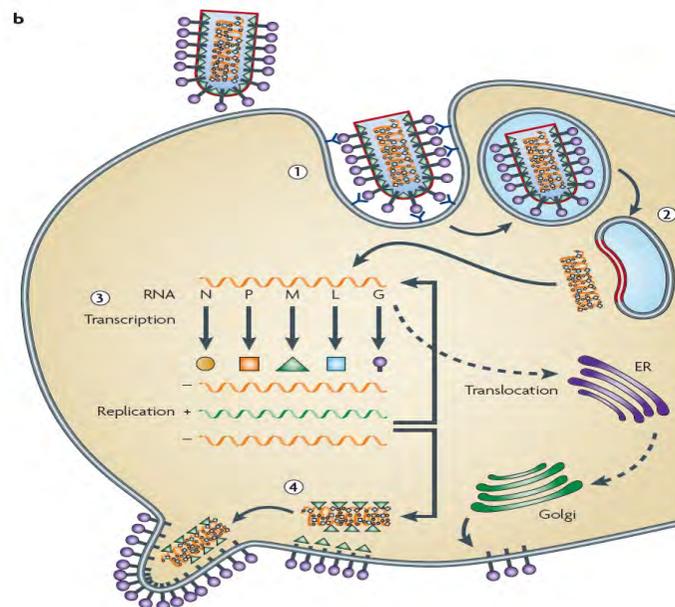


Figura 6. Ciclo de replicación del virus de la rabia. 1, entrada del virus a la célula por endocitosis. 2, fusión de la membrana viral con la del endosoma para la liberación de la nucleocápside. 3, procesos de transcripción, replicación y síntesis de proteínas virales. 4, ensamblaje y liberación de los viriones. Figura tomada de (23).

La última fase es la formación de los viriones (figura 6) y esto sucede cerca de la membrana plasmática donde ambas, la proteína M y la proteína G, tienen un papel importante en el proceso. La proteína M es capaz de polimerizarse por unión de un motivo rico en prolina con el dominio principal globular de la proteína adyacente. Esta proteína contiene “dominios tardíos” (que son dominios en los cuales una mutación puede detener la morfogénesis viral en la última fase), estos dominios también influyen en la construcción de los viriones por la interacción con las proteínas celulares que forman la vía de clasificación de proteínas vacuolares (“vacuolar protein sorting pathway”) (23). Al menos tres de estos dominios han sido identificados: ASAP, PPEY y YVPL, estos dos últimos se superponen, formando el motivo PPEYVPL (23).

Ambos virus (Aujeszky y de la rabia) son neurotrópicos, sin embargo sus mecanismos de infección, replicación y diseminación son muy diferentes, aunado a que el virus Aujeszky contiene un DNA de doble cadena como genoma mientras que en el virus de la rabia el genoma es de RNA de cadena sencilla y de polaridad negativa. Esto los hace muy divergentes y para empezar a estudiar las propiedades antivirales del líquido celómico del erizo de mar, *Tripneustes depressus*, se decidió escoger estos virus ya que no se tenían antecedentes sobre alguna propiedad antiviral o algún virus en particular. A continuación en los antecedentes se muestra que distintas moléculas aisladas de organismos invertebrados tienen actividad en contra de diferentes virus.

## **Antecedentes**

### *Antivirales*

Se han reportado aproximadamente 41000 AMPs (25). Distintas de ellos con actividad antimicrobiana y la mayoría en contra de bacterias y hongos dejando de lado la actividad antiviral. Esto debido a que se creía que era imposible bloquear la replicación del virus sin afectar el metabolismo de las células no infectadas, ya que los virus aprovechaban la maquinaria de replicación celular. Posteriormente, se observó que hay algunas características que sólo presentan las células infectadas, como la expresión de algunas enzimas virales (necesarias para la replicación viral), de este modo se ha buscado eventos específicos que puedan servir como blancos para la acción de antivirales (26).

Algunos de los eventos que sólo se presentan en las células infectadas con virus y que pueden servir como blanco para el desarrollo de moléculas antivirales son: i) la fusión de los viriones a la membrana celular, requerida tanto en la entrada como en la liberación de los viriones; ii) el anclaje proteolítico de los precursores de proteínas virales, el cual es necesario para el ensamble de los viriones; iii) la síntesis del DNA o RNA viral por las polimerasas virales; iv) la maduración del RNA mensajero (mRNA) viral y v) la glicosilación de proteínas virales (26).

La primera vez que se administraron antivirales en donde se obtuvieron buenos resultados fue en la década de los 60's, cuando Bauer aplicó metisazona (methisazone) a pacientes expuestos a viruela y Kaufman empleó Idoxuridina en pacientes con keratitis herpética. A finales de los 70's y principios de los 80's, se desarrolló y promovió el aciclovir, que fue

el primer agente antiviral que se aplicó en pacientes ambulatorios, así como en casos más severos (27). Sin embargo, existen hasta el momento pocos agentes antivirales con baja toxicidad celular, por lo que la búsqueda de nuevos agentes antivirales aún se sigue desarrollando. A continuación, se presentan algunas moléculas que han sido aisladas de organismos invertebrados y tienen efecto antiviral. *Invertebrados terrestres*

El plasma de la hemolinfa de *Heliothis virescens* presenta actividad en contra del nucleopolyhedrovirus de cápside sencilla de *Helicoverpa zea* (HzSNPV), los virus herpes simplex tipo 1 y 2, el virus de estomatitis vesicular, el virus de parainfluenza humana tipo 3, el virus Coxsackie B3 y el virus Sindbis; esta actividad se atribuye a la enzima profenol oxidasa (PO), ya que cuando se agregan inhibidores de la enzima, como el quelante de cobre 1-fenil-2-tiourea (PTU) se pierde la actividad antiviral y esta actividad se recupera cuando se agrega una fracción cromatográfica del plasma que contiene actividad PO (28, 29). Se sabe que la PO reconoce el 1,3- $\beta$ -glucanos en hongos, el LPS en bacterias gram-negativas y los péptidoglicanos de las bacterias gram-positivas pero el mecanismo de reconocimiento o activación con la presencia de los virus es aún objeto de estudio (29).

Una proteína de aproximadamente 20 kDa, aislada de la hemolinfa de la larva de la polilla, *Lonomia obliqua*, se probó en contra de los virus de sarampión, influenza y polio, observándose que es capaz de inhibir la replicación de estos virus 1 hr después de la infección (*in vitro*), lo que indica que puede actuar intracelularmente durante la replicación del virus o en el momento del ensamble de los viriones (30).

La escorpina aislada del veneno del escorpión *Pandinus imperator*, presenta actividad en contra del virus dengue setipo 2 (31).

Además moléculas consideradas como “inmunomoduladores” también se han aislado de invertebrados como es el caso de los aloferones (1 y 2) que son péptidos catiónicos, de 12 y 13 aminoácidos, presentes en la hemolinfa de la mosca, *Calliphora vicina*. El aloferón 1: estimula las células NK de sangre periférica humana, induce la síntesis de IFN en modelo de ratón y células NK de humanos, promueve la sobrevida cuando se reta a los ratones con virus de influenza A y B, e inhibe o retarda la formación de tumores cuando se inyectan células de linfoma en ratones. De hecho, una terapia basada en aloferón en contra de HSV, virus de hepatitis B y C está siendo estudiada (32).

Otra proteína considerada como inmunomodulador es el antígeno recombinante de *Eimeria spp* (protozoario), rEA. Esta proteína induce la producción de IL-12, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y MCP. Julander y colaboradores, encontraron que el rEA aplicado sólo o junto con un cóctel agonista (GM-CSF+IFN- $\gamma$ +IL-4+antiCD-40) disminuye los títulos virales en cerebro y aumenta la sobrevida, hasta un 50% en ratones infectados con virus Banzai, un modelo de encefalitis por flavivirus en ratones (33). En otro estudio, reportan que el rEA aplicado 36 horas después de un reto con virus Punta Toro, aumenta significativamente la sobrevida de los ratones y disminuye los títulos virales en suero (34).

### *Invertebrados marinos*

Entre las moléculas que reportan actividad en contra de virus se encuentra la taquiplesina del cangrejo cacerola (*Tachypleus tridentatus*), que mostró actividad antiviral en contra del virus influenza A y el VSV (35). El péptido sintético T22, análogo a la polifemusina II de *Limulus polyphemus*, tiene una fuerte actividad en contra del VIH y una relativa baja toxicidad comparada con el AZT (36).

Un péptido con actividad antiviral fue aislado de extractos del exosqueleto de la langostilla (*Pleuroncodes palnipes*), esta actividad se probó en contra del baculovirus AcNPV (37); además extractos musculares provenientes del mismo organismo tienen función antiviral en contra de otros virus como el virus Aujeszky (herpes porcino), virus LPM (rubulavirus porcino), el virus de influenza aviar, todos estos ensayos fueron realizados *in vitro* (38).

Las peneidinas son una familia de péptidos antimicrobianos aislados originalmente de hemocitos de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*), pero también se encuentran en *L. setiferus*. Esta familia presenta una estructura única de dos dominios y hasta ahora se han descrito cuatro clases de peneidinas, que incluyen en su secuencia líder un dominio rico en prolina y otro rico en cisteína, con una distribución de cisteínas muy conservada, también presentan un motivo Pro-Arg-Pro. Esta familia presenta una actividad antimicótica y contra bacterias gram-positivas (2, 39). Además, aunque no se ha demostrado la presencia del péptido, se ha logrado observar un aumento en la expresión del RNA mensajero cuando se reta a los camarones con virus de la mancha blanca (40).

Una molécula de 440 kDa proveniente de extractos tisulares del cangrejo azul (*Callinectes sapidus*) presenta actividad en contra de diferentes virus, pero el mayor efecto fue contra el virus Sindbis (41). Dos fragmentos de defensinas del mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) disminuyen la infección de las células MAGIC-5B por el VIH-1 por más del 70% y este efecto fue observado cuando los fragmentos se preincubaban con el virus (42). Otras dos moléculas aisladas del mejillón (*M. galloprovincialis*) son la mitilina y la miticina; la primera puede inhibir *in vitro* la infección por el WSSV y la miticina se probó en contra del VHSV y el IPNV observando 85 y 75 % de inhibición, respectivamente (43).

La hemolinfa del abulón, *Haliotis laevigata* y *H. rubra*, tiene efecto en contra del HSV-1, este efecto es mayor cuando la hemolinfa proviene de animales silvestres en comparación con la obtenida de animales de granja y la diferencia se puede deber a que los abulones en granjas están sometidos al estrés del manejo y la explotación, además su alimentación es a base de dietas artificiales, mientras que los abulones silvestres además de comer algas (de las cuales también se han aislado moléculas con actividad antiviral) viven en un ambiente en el que tienen constante contacto con microorganismos lo que estimula el sistema inmune de los animales (44). También, la hemolinfa de la ostra, *Cassostrea gigas*, presenta actividad en contra de los virus de HSV, IPNV, VIH-1 y el colifago T3 (45, 46, 47).

En otro estudio la hemolinfa de 5 especies de moluscos se probó en contra del virus HSV-1, *in vitro*; en donde el extracto ácido de la hemolinfa de *Cerastoderma edule* fue la fracción más activa, otras fracciones provenientes de *Ostrea edulis* y *Buccinum undatum*, también presentan una alta inhibición, pero estas son también más tóxicas para las células Vero (48).

## **Planteamiento del problema**

La mayoría de los trabajos en los que se reporta la presencia de moléculas con actividad contra patógenos o la síntesis de péptidos antimicrobianos se han realizado en artrópodos, dejando de lado a los equinodermos que, junto con los hemicordados y xenoturbelidos, son los invertebrados que se encuentran más relacionados a los cordados, formando el grupo de los deuterostomados. Además, los efectos más estudiados son el anti-bacteriano o el anti-micótico, dejando de lado la defensa en contra de los virus.

Los antecedentes muestran que moléculas aisladas de invertebrados marinos, tienen actividad en contra de diferentes virus, incluyendo aquellos que no los infectan de forma natural (virus de vertebrados). Además conociendo que algunos antivirales tienen algún efecto secundario en el organismo al que se le aplica, la búsqueda y caracterización de nuevas moléculas con actividad antiviral nos ayudará a aumentar el arsenal terapéutico con la finalidad de controlar y combatir eficazmente la infección con el fin de evitar la propagación de enfermedades virales.

## **Justificación**

La búsqueda de moléculas que intervienen en la defensa en invertebrados en contra de los virus nos puede ayudar a proponer nuevos candidatos a fármacos, debido a que en estos organismos una de las estrategias inmunológicas fue desarrollar moléculas que reconocen PAMPs en un gran número de patógenos. Suponiendo que estos PAMPs se

conservan dentro de las familias de microorganismos, las moléculas aisladas de los invertebrados no sólo pueden servir en contra de sus agentes específicos, sino que también se pueden emplear en contra de otros virus, como aquellos que infectan a los vertebrados. Además hasta el momento existe un número limitado de antivirales. Por esto la búsqueda de nuevas moléculas que puedan actuar en contra de los virus ampliará nuestro arsenal de estrategias y posibilidades de resolver las enfermedades virales.

### **Hipótesis**

Si en otros invertebrados marinos se han encontrado moléculas que actúan en la defensa en contra de los virus, en los equinodermos (erizo de mar) también se pueden identificar moléculas que presenten actividad antiviral.

### **Objetivos**

#### *General*

Determinar si el líquido celómico del erizo de mar, *Tripneustes depressus*, tiene actividad antiviral.

#### *Particulares*

1. Probar el líquido celómico de *T. depressus* contra el virus de la rabia (cepa PV; RNA de polaridad negativa) y el virus Aujeszky (herpes porcino) (cepa Barta: DNA de

doble cadena), empleando pruebas de neutralización y/o inhibición de la replicación viral.

2. Purificar y caracterizar la(s) proteína(as) o péptidos con actividad antiviral.
3. Verificar que las moléculas aisladas no tengan efecto citotóxico, *in vitro*.

### Materiales y métodos

En la figura 7 se muestra un esquema general de la estrategia de trabajo, desde la toma de muestra hasta los ensayos *in vitro* y bioquímicos.

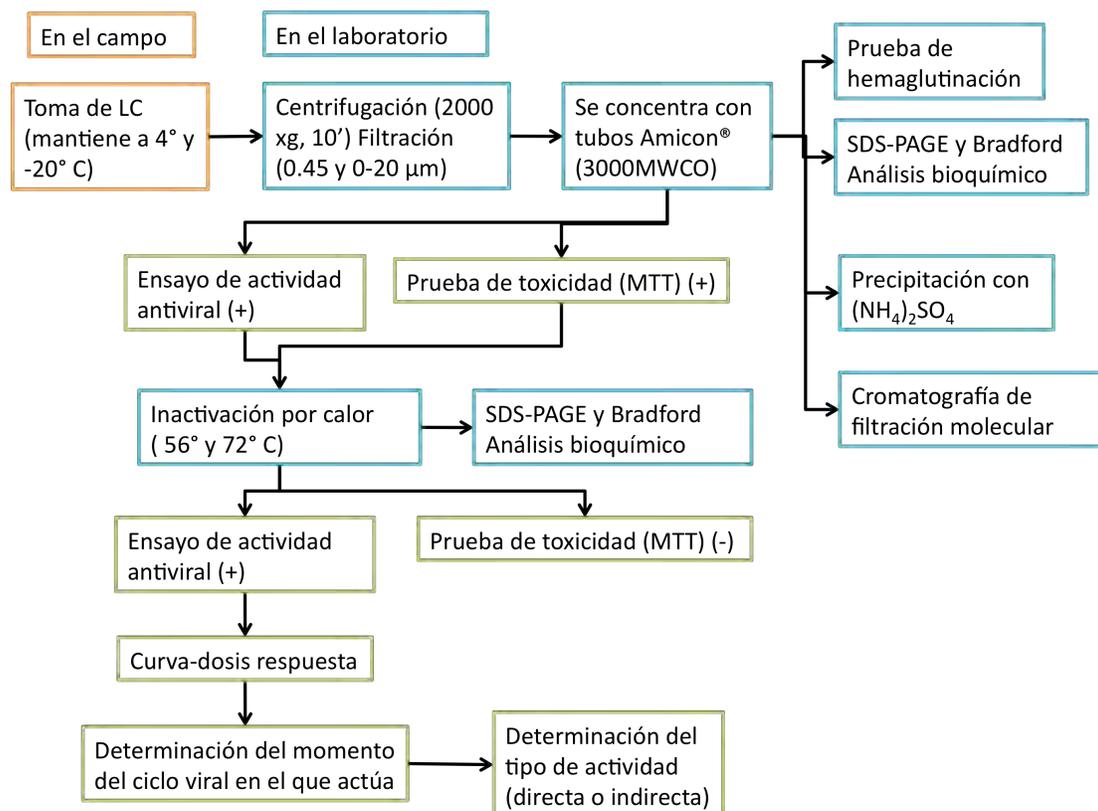


Figura 7. Diagrama de flujo con la estrategia de trabajo.

### Área de recolecta y toma del líquido celómico (LC)

Se realizaron dos recolectas (8 al 13 mayo y 30 de noviembre al 2 de diciembre del 2007) a la Bahía de los Muertos, Baja California Sur, México (figura 8). Aproximadamente, 50 erizos fueron recolectados uno a uno con la mano. Los erizos se matuvieron cerca de la playa entre las rocas y sumergidos en el agua hasta que se les tomó la muestra. Para obtener el LC se introdujo una jeringa de 10 ml por la boca y se aspiró (entre 10 y 15 ml de LC por animal). Después de esto los erizos se regresaron al mar.



Figura 8. Mapa donde se muestra el sitio de recolecta (Ensenada de Muertos, BCS) de los erizos de mar, *Tripneustes depressus*.

El LC se mezcló se mantuvo en frío en la playa y posteriormente en congelación (-20° C) hasta su arribo al laboratorio en donde se descongeló y centrifugó a 2000 xg durante 10' a 4° C. El sobrenadante se filtró con membranas de 0.45 y 0.20 µm. Después, se hicieron alícuotas de 50 ml y se almacenaron a -70° C hasta su uso. Antes de usar, cada alícuota el LC se concentró por centrifugación usando tubos Amicon® Ultra 15 3K MWCO (Millipore, UFC900324) a 5000 xg durante 30' a 20° C.

#### *Inactivación por calor*

El líquido celómico se inactivó por calor bajo dos condiciones: 56° C por 30' (condiciones empleadas para inactivar las moléculas del complemento en sueros de varias especies de vertebrados) y 72° C por 20' [condiciones empleadas por Galvez *et al.* (2011) para desnaturalizar proteínas de alto peso molecular (37)]. Posteriormente, se centrifugó a 11 200 xg durante 10' a 4° C. Se separó el sobrenadante (SN) del precipitado (PP) y este último se resuspendió en la mitad del volumen inicial con PBS pH 7.4.

Se hizo el ensayo de citotoxicidad por MTT para todas las muestras (nativa e inactivadas a distintas temperaturas), además de los ensayos de inhibición para los virus Aujeszky y de la rabia. Todos descritos a continuación.

#### *Ensayo de citotoxicidad*

Se evaluó la citotoxicidad del LC nativo e inactivado por calor a distintas temperaturas por el ensayo de reducción metabólica del bromuro de MTT por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. El producto de la reducción del MTT son cristales de formazán

y la cantidad de estos es proporcional a la cantidad de células vivas; el ensayo se realizó de acuerdo con el método de Mena y colaboradores (49). Brevemente, en una placa de 96 pozos se colocaron 100 µl de medio de cultivo (Glasgow 1X sin suero) y se hicieron ocho diluciones dobles seriadas del LC iniciando con 50 µg en 100 µl. Posteriormente, se sembraron 30 000 células/pozo y se incubaron por 48 hrs (para las células BHK-21) y 72 hrs (para las células MDBK) a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub> y atmósfera húmeda; esto es, simulando las condiciones de los ensayos de infección. Transcurrido el tiempo se descartó el sobrenadante y se agregaron 50 µl de medio de cultivo sin suero más 10 µl de solución de MTT (5 g/L) por pozo. La placa se incubó a 37° C en agitación por dos horas y al terminar el tiempo se centrifugó a 2000 xg por 10'. Se descartó el sobrenadante, se agregaron 50 µl de DMSO (dimetil sulfóxido) y se puso en agitación por 15' a temperatura ambiente, para disolver los cristales de formazán (producidos sólo en las células vivas). Al final se midió la absorbancia en un lector de microplacas (DYNATHEC MR 5000) a 570 nm y se calculó el porcentaje de viabilidad comparando con los controles (control de células, 100% de viabilidad). Para control de toxicidad las células se trataron con tritón 100X al 1% en PBS pH 7.4 antes de adicionar el MTT más medio de cultivo. Los ensayos se realizaron por duplicado.

#### *SDS-PAGE y cuantificación de proteínas por Bradford*

Para visualizar los componentes de origen proteico que contiene el LC se realizaron geles de acrilamida al 12.5%. En la tabla 2 se muestra la conformación de los reactivos para preparar los geles.

Se cargaron 20 µg de muestra + 5 µl de buffer de carga 5X. Como referencia se usaron 5 µl de PageRuler™ Plus (Fermentas, #SM1811). Se empleó el buffer de corrida (Tris-SDS pH 8.3) y las muestras se corrieron a 15 mA hasta que entraron al gel de resolución y después a 30 mA durante hora y media a dos horas, hasta que el frente de corrimiento se saliera del gel.

Tabla 2. Composición de los geles de resolución y empaque en el SDS-PAGE.

Reactivo	Gel de resolución al 12.5 %	Gel de empaque
Acrilamida/bis-acrilamida (30/0.8%)	4.7ml	1.3ml
Buffer de resolución pH 8.8	3ml	-
Buffer de empaque pH 6.8	-	1.25ml
Agua bidestilada	3.2ml	7ml
SDS 10%	120µl	-
NaCl 20%	240µl	-
APS 10%	60µl	50µl
TEMED	12µl	8µl

Después del corrimiento el gel de acrilamida se sumergió en una solución de fijación (metanol: ácido acético: agua bidestilada; 50:10:40) por 30' a temperatura ambiente. Posteriormente, se tiñó con una solución de azul de Coomassie 250, durante toda la noche a temperatura ambiente y se destiñó con la solución decolorante (metanol: ácido acético: agua bidestilada; 30:30:40), hasta que se distinguieron las bandas de proteínas. Para la tinción con nitrato de plata se utilizó el kit "Silver stain plus" (BIO-RAD, 161-0449) de acuerdo con las instrucciones recomendadas por el fabricante.

La cantidad de proteínas contenidas en el líquido celómico se cuantificó por el método de Bradford (50) en la modalidad de microensayo para tratar de optimizar las muestras. Esta

técnica se basa en que el azul de Coomassie (colorante base del reactivo) se une principalmente a aminoácidos con residuos básicos y aromáticos (especialmente arginina), así da un cambio de color que se puede leer a 595 nm; el complejo colorante proteína es estable durante una hora y en un modelo con albúmina se observó que el coeficiente de extinción fue constante por más de 10 veces la concentración, por lo que se puede aplicar la ley de Beer-Lambert para poder determinar la cantidad de proteína en una solución (50). En un placa de 96 pozos se colocó primero una curva de referencia con  $\gamma$ -globulina (Bio-Rad, No. de catálogo 500-0005) que inició con una concentración de 1.52  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  llegando hasta 12.56  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y se ajustó a 10  $\mu\text{l}$  con solución salina (0.9% de NaCl). Se hicieron diluciones 1:2 y 1:10 de las muestras con solución salina (0.9% de NaCl) y se agregaron 10  $\mu\text{l}$  de cada dilución por pozo. Tanto las muestras como la curva de referencia se colocaron por duplicado en la placa de 96 pozos. Posteriormente, se adicionaron 190  $\mu\text{l}$  de solución de Bradford (Bio-Rad, No. de catálogo 500-0006) (la cual fue diluida previamente a 1X con agua bidestilada y filtrada para quitar cualquier precipitado o impureza). Una vez que se colocó la solución de Bradford en la placa esta se cubrió de la luz y se incubó por 10' a temperatura ambiente, al finalizar el tiempo se leyó la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas (DYNATHEC MR 5000).

Para estimar la concentración de proteína en cada muestra se hizo una correlación entre absorbancia y cantidad de proteína con la curva de referencia, en donde para que el ensayo sea válido el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) debe de ser mayor o igual a 0.98; así con la fórmula de la recta,  $y=Ax+B$  se determinó la concentración de la proteína donde  $y$ , es la absorbancia a 570 nm;  $A$ , es la pendiente;  $x$ , es la concentración de la muestra y  $B$ , es

la ordenada al origen. Esta correlación sólo se mantiene dentro los valores máximo y mínimo de la curva de referencia, si la lectura a 570 nm de las muestras se encontraba por arriba o por debajo de los valores de referencia se hicieron más diluciones o puso la muestra más concentrada, según fuese el caso.

En los casos en donde al colocar la muestra sin diluir nos dio lecturas por debajo del valor mínimo de la curva de referencia, se utilizó el método de absorbancia a 280 nm (luz UV) para determinar la concentración de proteína. Las lecturas se hicieron en un biofotómetro (Eppendorf).

#### *Análisis Bioquímico*

En la literatura no se encontraron antecedentes sobre la composición del LC se hizo un análisis bioquímico en un equipo para análisis clínicos marca HITACHI P800 para determinar la cantidad de colesterol, triglicéridos, glucosa, N urea y diferentes iones como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , tanto en las muestras nativas como en las inactivadas (SN o fracción termoestable). Además se determinó el pH con un potenciómetro (BECKMAN  $\Phi$ 360).

#### *Ensayo de hemaglutinación*

Además como parte de la caracterización del LC completo, también se realizó un ensayo de hemoaglutinación (descrito a continuación) con eritrocitos de distintas especies para conocer si había alguna molécula (tipo lectina) que aglutinara de manera preferencial las células y tratar de caracterizar mejor lo que contiene el líquido celómico.

Primero, de cada especie (conejo, cuyo, humano "O" Rh(+), murciélago, rata y ratón) se tomaron entre 2 y 5 ml de sangre completa en solución de Alsevers (vol/vol), se mezcló y se centrifugó a 250 xg por 10', cada muestra se lavó tres veces con 3 ml de PBS pH 7.4. Al final quedó el botón de celular y se preparó una solución al 0.5% de eritrocitos en PBS pH 7.4 (50 µl de eritrocitos en 10 ml de PBS) y se mantiene a 4° C en lo que se hacen las diluciones de la muestra.

En una placa de 96 pozos con fondo en "V" (Sarsted, 82.1583) se realizaron 12 diluciones dobles del LC con PBS pH 7.4 como diluyente e iniciando con el LC sin diluir (50 µl). Después se agregaron 50 µl de la solución de eritrocitos al 0.5% y se dejó incubar una hora a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se realizaron las observaciones para saber hasta que dilución y de que especie el LC aglutina los eritrocitos.

### *Células y virus*

Se emplearon las líneas celulares MDBK o NBL-1 (ATCC No. CCL-22) y BHK-21 (ATTC NO. CCL-10), ambas se mantienen a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub> y atmósfera húmeda. Se empleó el medio Glasgow (Invitro SA, ME055), suplementado con antibiótico-antimicótico 1X (Invitro SA, A07), 1.1% de piruvato de sodio, glutamina 25 mM, HEPES 25 mM y se ajusta el pH a 7.2-7.4 con bicarbonato de sodio al 7.5%. Para propagar las células se adiciono suero fetal bovino (GIBCO®, 16000-044) al 10% y se uso medio sin suero para la propagación del virus y los ensayos de infección.

El virus Aujeszky (cepa Barta) se propagó en las células MDBK de la siguiente manera (51). A una botella de cultivo celular de 75 cc con una monocapa confluyente de células se le

descartó el sobrenadante y se le inoculó con 5 ml de virus semilla diluido 1:10 con medio sin suero. Se incubó por una hora a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub> y atmósfera húmeda para que el virus de adsorbiera. Posteriormente, se retiró el inoculo y se le agregaron 15 ml de medio Glasgow sin suero para incubarla durante 72 hrs en las mismas condiciones. Transcurrido el tiempo la botella se puso a -70° C y al siguiente día se descongeló sobre una cama de hielo. El sobrenadante se clarificó por centrifugación a 2000 xg por 15' y se hicieron alícuotas de 1 ml para mantenerlas a -70° C hasta su uso.

Una alícuota de cada lote de virus tituló por placas líticas para conocer para conocer la cantidad de partículas infecciosas por mililitro y ajustar los ensayos de infección a 80 UFPs (51).

En el caso del virus de la rabia (cepa PV) se emplearon las células BHK-21 y la propagación se hizo del mismo modo que para el virus Aujeszky, sólo que en este caso el cultivo de células ya infectado se incubó por 48 hrs. El lote de virus también se alicuotó y guardo a -70° C hasta su uso. La titulación se hizo por focos fluorescentes para ajustar la solución de trabajo a 30 UFFs (52).

#### *Ensayos de inhibición viral in vitro*

Virus Aujeszky. Para determinar si el líquido celómico tiene actividad en contra de este virus se realizó un ensayo de inhibición de la formación de placas líticas como se describe a continuación (51). En una placa de 24 pozos (Corning®, 2471) se sembraron las células MDBK (aproximadamente 150 000 células/pozo) con medio Glasgow suplementado con 10% de SFB, para obtener una monocapa a las 24 hrs de incubación a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub>

y atmósfera húmeda. Posteriormente, se retiró el sobrenadante, las células se lavaron tres veces con 500 µl de PBS pH 7.4 y se agregó una mezcla que contiene 63 µg en 150 µl de LC más 80 UFPs en 150 µl de virus Aujeszky. La placa se incubó durante una hora a las mismas condiciones del cultivo celular. Después se descartó el sobrenadante, las células se lavaron tres veces con 500 µl de PBS pH 7.4 y se agregó un mililitro de medio Glasgow sin suero + 0.75% de carboximetilcelulosa.

Así, la placa se incubó durante 72 hrs a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub> y atmósfera húmeda, transcurrido este tiempo se agregaron 400 µl/pozo de formaldehído al 10% con PBS pH 7.4 para fijar las células y se incubó por 45' a temperatura ambiente. Después se retiró el sobrenadante, se agregaron 400 µl/pozo de cristal violeta 0.3% y se incubó por 15' a temperatura ambiente para teñir el tapiz celular y poder distinguir mejor las placas líticas. Finalmente, se descartó el colorante, la placa se lavó con agua corriente (hasta que el agua descartada saliera transparente) y se dejó secar por unos minutos para poder observar y contar las placas líticas en un microscopio estereoscópico (ZEISS, Stemi 2000). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Virus de la rabia. Para conocer si el LC puede inhibir la infección de las células BHK-21 por el virus de la rabia (cepa PV) se realizó la prueba rápida de detección de focos fluorescentes. Este ensayo es la prueba de oro, recomendada por la OMS, para observar neutralización del virus *in vitro*; además esta prueba nos permite dar un estimado de la actividad, ya que el resultado se expresa en UI/ml, por que se compara contra un suero de referencia con concentración conocida (52). Como suero de referencia se empleó

inmunoglobulina humana antirrábica (Berirab®) ajustada a 10 UI/ml. La OMS establece como nivel mínimo protector el valor de 0.5 UI/ml.

Brevemente, en una placa de 96 pozos de fondo plano (NUNC, 167008), se colocaron 100 µl/pozo de medio Glasgow sin suero como diluyente, excepto en los pozos de control de células a los cuales se les agregaron 150 µl de medio sin suero. Se realizaron ocho diluciones triples de cada muestra, iniciando con una concentración de 35 µg de LC en 50 µl. Como suero de referencia se empleó inmunoglobulina humana antirrábica ajustada a 10 UI/ml (Berirab\*P Aventis-Behring). Después se agregaron 50 µl/pozo de virus rábico que presentaba un título de 30 UFFs, en todos los pozos excepto en el control de células. La placa se incubó por 1 hr a 37° C en atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>. Al término de la incubación, se agregaron 30 000 células BHK-21 en cada pozo y se volvió a incubar la placa en las mismas condiciones, ahora durante 48 hrs.

Posteriormente, se descartó el sobrenadante de la placa y para fijar las células se utilizaron 55 µl/pozo de Cytofix/Cytoperm (BD®, 554714) incubando la placa durante 45' a 4° C. Después se descartó esta solución y se adicionaron 60 µl/pozo de un anticuerpo antirrábico monoclonal conjugado a fluoresceína (FUJIREBIO Diagnostics, Inc) diluído 1:64 con PBS pH 7.4 + BSA al 0.5%. La placa se incubó durante 45' a 37° C en atmósfera húmeda, se lavó con agua corriente y se le adicionaron 80 µl de líquido de montaje (glicerol:PBS, v/v a pH 8.3). Por último, se observó en el microscopio invertido de larga distancia focal con lámpara UV (OLYMPUS, IMT-2) para realizar el conteo de focos fluorescentes. Para calcular las UI/ml de cada muestra (como reflejo de la neutralización del virus) se empleó el método de Reed and Muench (54). Para calcular el porcentaje de

inhibición de la infección se considero sólo la dilución 1:3 de las muestras, que es la condición en la que esta más concentrado el líquido celómico y nos permite hacer la comparación en porcentaje con el suero de referencia. El ensayo se realizó por triplicado.

#### *Curva dosis-respuesta*

Para conocer la cantidad de LC que inhibe a los virus se realizaron curvas dosis-respuesta. Se hicieron diluciones seriadas dobles del LC iniciando con 33 µg y hasta 0.6 µg en el caso del virus Aujeszky y para el virus de la rabia se realizaron diluciones seriadas triples, iniciando con 42 µg y hasta 10.5 µg. Las pruebas se realizaron en las mismas condiciones que los ensayos de inhibición, previamente descritos. Las pruebas se realizaron por triplicado para cada virus.

#### *Determinación del momento del ciclo viral sobre el cual actúa el LC*

Para tratar de identificar el parte del ciclo viral el LC inhibe al virus Aujeszky y el virus de la rabia se realizaron los siguientes experimentos:

i) *Pre-infección*. El LC se agregó sobre una monocapa de células (MDBK o BHK-21) y se incubó por una hora a 37° C. Después el LC se descartó y se sustituyó con virus, Aujeszky o rabia según sea el caso, para volver a incubar durante una hora a 37° C. Por último, el virus se descartó y se agregó medio Glasgow sin suero para una incubación final de 48 o 72 hrs según el virus. En el caso de la placa de células MDBK al final se agregó medio Glasgow + 0.75% de carboximetilcelulosa. En este caso el LC podría actuar sobre el receptor del virus en la célula.

ii) *Neutralización*. En un tubo tipo eppendorf de 1.5 ml se hizo una mezcla de LC + virus (Aujeszky o rabia) y se incubó durante una hora a 37° C. Después la mezcla se agregó sobre las células respectivas, previamente sembradas en una placa de cultivo y las placas se incubaron por una hora a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda. Pasado el tiempo la mezcla de LC + virus se sustituyó por medio Glasgow sin suero y las placas se incubaron por 72 para el virus Aujeszky y 48 hrs para el virus de la rabia. En este caso el LC actúa antes de la entrada del virus a la célula.

iii) *Post-infección*. El virus (Aujeszky o rabia) se incubó durante una hora sobre una monocapa de células (MDBK ó BHK-21, respectivamente). Después el virus se descartó y se agregó el LC para volver a incubar por una hora. Finalmente, se retiró el LC y se agregó medio Glasgow sin suero + 0.75% de carboximetilcelulosa para incubar durante 72 hrs (virus Aujeszky) o 48 hrs (virus de la rabia). Aquí el LC podría actuar en algún paso de la replicación viral.

El método de revelado se hizo conforme lo previamente descrito y todos los ensayos se realizaron por triplicado con sus respectivos controles de células y virus.

#### *Determinación del tipo de actividad (directa o indirecta)*

Para saber si el efecto antiviral del LC es directo (necesita estar presente en la solución) o indirecto (el LC estimula a las células para producir alguna otra molécula que tenga la acción antiviral) se realizó el siguiente ensayo.

En una placa de 6 pozos (Corning®, 3473) que contenía una monocapa de células previamente lavada tres veces con PBS pH 7.4 (BHK-21 para el virus de la rabia y MDBK para el virus Aujeszky) se agregaron 500 µl/pozo de LC y se incubó durante una hora a 37° C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, se descartó el sobrenadante y las células se lavaron tres veces con PBS pH 7.4, se agregaron 2 ml de medio Glasgow sin suero por pozo y las placas se incubaron a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda durante 48 hrs las células BHK-21 y 72 hrs las células MDBK, cada placa contenía dos pozos controles de células a los que no se les agregó LC. Posteriormente, se recuperó el SN, se hicieron alícuotas de 500 µl y se almacenaron a -70° C hasta su uso.

Después en tubos tipo eppendorf de 1.5 ml se hizo una mezcla de 150 µl de SN de células MDBK + 80 UFPs/150 µl de virus Aujeszky y 50 µl de SN de células BHK-21 + 30 UFFs/50 µl y se incubaron durante una hora a 37° C, junto con sus respectivos controles de sobrenadantes de células sin virus, virus sin LC y LC + virus, en las mismas proporciones. Posteriormente, las mezclas se agregaron a las placas de cultivo que contenían monocapas de células, BHK-21 (96 pozos) y MDBK (24 pozos), respectivamente y se incubaron durante una hora a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda. En el caso de las células BHK-21, al final se agregaron 50 µl/pozo de medio Glasgow sin suero. A partir de este momento las placas se trataron del mismo modo que en los ensayos de inhibición y/o neutralización previamente descritos. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

### *Análisis estadístico*

Todos los datos fueron analizados con el programa SPSS versión 22 empleando un análisis de varianza de una sola vía (one-way ANOVA) para saber si las diferencias entre los grupos eran significativas ( $p < 0.05$ ) y como prueba post-hoc se usó la prueba de Tukey para determinar entre que grupos las diferencias eran significativas ( $p < 0.05$ ).

### *Separación de la fracción de líquido celómico (LC) con actividad antiviral*

Para empezar a aislar la(s) molécula(s) del líquido celómico responsables de la actividad antiviral se realizaron varios procedimientos, ya que no se encontraron antecedentes que nos pudieran orientar para elegir la mejor opción de purificación.

### *Precipitación con sulfato de amonio*

Un método para purificar proteínas con distinta solubilidad es la precipitación con una solución saturada de sulfato de amonio  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ , se hicieron tres precipitaciones seriadas llevando al LC (previamente concentrado por centrifugación con tubos Amicon® de 10 000 MWCO, 4500 xg, 35' a 4° C) a concentraciones de 40, 45 y 50% de saturación. Se inició con 6.5 ml de LC y se agregaron 4.33 ml de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (53) por goteo durante 30' en frío (4° C) y con agitación, después se dejó en reposo durante una hora a 4° C. Después la solución se centrifugó a 4500 xg durante 35' al finalizar se separó el SN del PP y este último se resuspendió en la mitad del volumen inicial con PBS pH 7.4. El SN del 40% (4.25 ml recuperados) se sometió de nuevo al mismo proceso para ahora agregar 3.5 ml de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y que las proteínas precipiten con 45% de la sal. Al final de nuevo se separan el

SN del PP y se continua el proceso para ahora precipitar las proteínas con 50% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (iniciando con 3.6 ml de SN 45% de LC y agregando 3.6 ml de la solución saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . De cada SN se tomó una alícuota de aproximadamente 2 ml antes de pasar a la siguiente concentración de la sal; así todas las muestras de SN y PP se dializaron contra un litro de PBS pH 7.4 durante 72 hrs (con cambios cada 24 hrs) empleando una membrana de celulosa 12000 MWCO (SIGMA, D9652-100FT). Al final, de cada muestra se tomaron 200  $\mu\text{l}$  para hacer un gel SDS-PAGE y cuantificar las proteínas por Bradford, como anteriormente se describió. El resto de la muestra se usó para hacer las pruebas de inhibición de cada virus.

#### *Cromatografía de filtración molecular*

Una muestra del líquido celómico se corrió en una columna de filtración, Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech, 17-1088-01), con la cual se pueden separar proteínas y péptidos entre un rango de peso molecular de 10 000 a 600 000. Como buffer de corrida se empleo el recomendado por el proveedor (fosfato de sodio 50 mM pH 7 + 0.15 M de cloruro de sodio). Primero se calibró la columna con 500  $\mu\text{l}$  de un coctel de proteínas de distinto PM que contiene: tiroglobulina (669 000 PM), IgG humana (150 000 PM), Ovoalbumina (43 000 PM), Mioglobilina (17 600 PM) y Vitamina B12 (1 355 PM) (BioRad®) y se corrió con un flujo de 0.25 ml/min, durante 60 minutos. Con esto se obtuvo un cromatograma con los valores de referencia para poder comparar con el cromatograma que se obtenga del LC. Después se cargaron 500  $\mu\text{l}$  de LC ( 1.4 mg) y se corrieron con el mismo buffer de elución (fosfato de sodio 50 mM + 0.15 M de cloruro de

sodio) con un flujo de 0.5 ml/min. Se colectaron fracciones de un mililitro para cuantificar por Bradford, correr un SDS-PAGE y empezar a probar su actividad antiviral.

## Resultados

### *Análisis bioquímico, cuantificación de proteínas y visualización en SDS-PAGE*

El líquido celómico del erizo de mar (*Tripneustes depressus*) contiene muchas moléculas y en distintas proporciones, tales como: colesterol (<2 mg/dL), triglicéridos (6 mg/dL), glucosa (4 mg/dL), nitrógeno ureico (<3 mg/dL), proteínas totales (3.072 µg/µL) y distintos iones como Ca<sup>2+</sup>(30.47 mg/dL), Mg<sup>2+</sup>(9.4 mEq/L), Na<sup>+</sup>(481 mmol/L), K<sup>+</sup>(12 mmol/L), Cl<sup>2-</sup>(639 mmol/L). En general cuando el LC fue expuesto a 56° y 72° C, la cantidad de colesterol, triglicéridos, glucosa, nitrógeno ureico, proteínas y los distintos iones no cambia dramáticamente en los SNs, como se puede observar en la tabla 3. El pH del LC (original o SNs de ambas temperaturas) fue de 7.4.

Por el contrario, en los PPs de ambas temperaturas sólo cinco componentes se lograron detectar: glucosa, nitrógeno ureico, proteínas, Na<sup>+</sup> y Cl<sup>2-</sup>, pero la mayoría siempre en cantidades menores que en las de su respectivo sobrenadante (de 56 o 72° C). Sólo la cantidad de nitrógeno ureico fue mayor en los PP que en los SN (ejemplo, 1.3 vs <0.5 mg/dL en la muestra expuesta a 72 °C) (tabla 3). En lo que respecta a las proteínas, es importante mencionar que la cantidad en los PPs (56 o 72° C) fue muy poca y además se encontraban formando una suspensión, más que una solución (es decir eran insolubles).

De hecho la detección de proteínas en estas muestras se hizo por absorbancia a 280 nm, porque por el método de Bradford fueron negativas y formaban precipitados.

Tabla 3. Análisis bioquímico del líquido celómico y las fracciones (SN y PP) obtenidas de la inactivación por calor a 56 y 72° C y centrifugación a 11 200xg.

Analito	Líquido celómico				
	original	Fracción obtenida por inactivación con calor (°C) y centrifugación 11200xg 20'			
		SN 56	PP56	SN72	PP72
Colesterol (mg/dL)	<2	<2	-	<2	-
Triglicéridos (mg/dL)	6	8	-	7	-
Glucosa (mg/dL)	4	4	1	4	2
Nitrógeno ureico (mg/dL)	<3	2.1	1.2	<0.5	1.3
Proteínas totales (µg/µL)	3.072	2.13	0.24*	1.48	0.35*
Ca <sup>2+</sup> (mg/dL)	30.47	29.82	-	30.54	-
Mg <sup>2+</sup> (mEq/dL)	9.4	9.38	-	9.4	-
Na <sup>+</sup> (mmol/L)	481	488	257	488	281
K <sup>+</sup> (mmol/L)	12	12.2	5.8	12.1	6.4
Cl <sup>2-</sup> (mmol/L)	639	642	319	644	319

\*la determinación de proteínas en estas muestras se hizo por absorbancia a 280 nm, por Bradford fueron negativas.

Las proteínas contenidas en el LC se pueden observar en el SDS-PAGE al 12.5% (figura 9). El LC original se obtiene de los erizos (después de ser clarificado y filtrado) tiene aproximadamente 0.3072 µg/µl (figura 9, carril 2); cuando fue concentrado en los tubos Amicon® de 3K MWCO, la cantidad de proteína cambio a 3.072 µg/µl (figura 9, carril 3),

debido a que se redujo el volumen (de 50 ml de LC original a 5-6 ml de LC concentrado) y fue así como se usó los siguientes ensayos.

Las diferencias entre los SNs y los PPs de ambas temperaturas (56 y 72° C), se pueden observar en los carriles 4 al 7. Los SNs o fracciones termoestables conservan cuatro proteínas (figura 9, carriles 4 y 6): una de  $\approx 25$  kDa, dos entre 55 y 72 kDa y una de  $\approx 150$  kDa, ésta última es claro que se conserva sólo en los SNs. Mientras en el PP de 72° C (figura 9, carril 7), hay dos bandas: una de  $\approx 40$  kDa y otra de  $\approx 45$  kDa que sólo se encuentran en esta muestra.

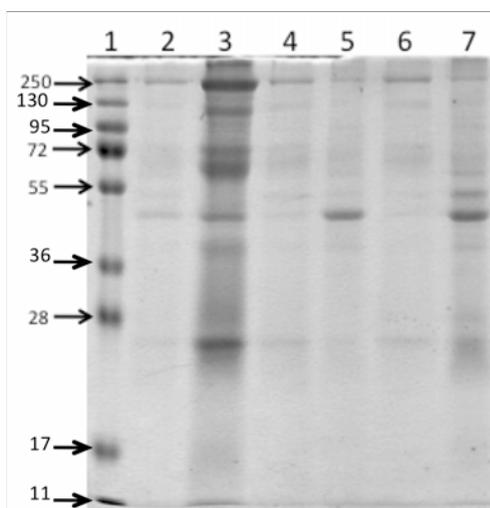


Figura 9. SDS-PAGE al 12.5% del líquido celómico (LC) de *Tripneustes depressus*, teñido con azul de Coomassie. 1, marcador molecular (Fermentas, #SM1811); 2, LC original; 3, LC concentrado con los tubos Amicon® 3k MWCO; 4, SN del LC calentado a 56° C; 5, PP de la misma temperatura; 6, SN de LC a 72° C y 7, PP de LC a 72° C.

### *Ensayo de hemaglutinación*

Los resultados de este ensayo se expresan de manera semi-cuantitativa, comparando entre las diferentes especies del efecto del LC. Se encontró que el LC de erizo de mar aglutina los eritrocitos de rata hasta la dilución 1:16 (+++) y los de humano tipo "O" Rh (+) hasta la dilución 1:4 (++) (tabla 4). También se observó un efecto de lisis sobre los eritrocitos de conejo hasta la dilución 1:256 (+++) y en menor grado en los de humano (dilución 1:2, +). En los eritrocitos de las otras especies no hubo efecto alguno.

Tabla 4. Hemaglutinación de eritrocitos de distintas especies por el líquido celómico del erizo de mar, *Tripneustes depressus*. Entre paréntesis se muestra la mayor dilución a la que se observó el efecto correspondiente.

Especie	Hemaglutinación	Lisis
Conejo	-	+++ (1:256)
Cuyo	-	-
Humano tipo "O"	++ (1:4)	+
Rata	+++ (1:16)	-
Ratón	-	-
Murciélago	-	-

### *Citotoxicidad del líquido celómico a las líneas celulares MDBK y BHK-21*

Se realizó el ensayo de MTT para asegurar que la de inhibición de los virus por el LC no sea un efecto de la toxicidad en el cultivo celular por el mismo LC. Se encontró que el LC es tóxico para ambas líneas celulares, pero lo es más para las células MDBK. Con 50 µg de LC,

las células MDBK presentan un 55% de viabilidad, mientras que las BHK-21 tienen un 90%. Sin embargo, el efecto tóxico del LC hacia las células se puede eliminar cuando se calienta (tanto a 56 como a 72° C), ya que con la misma cantidad (50 µg), la viabilidad de ambas líneas celulares es del 100% (figura 10).

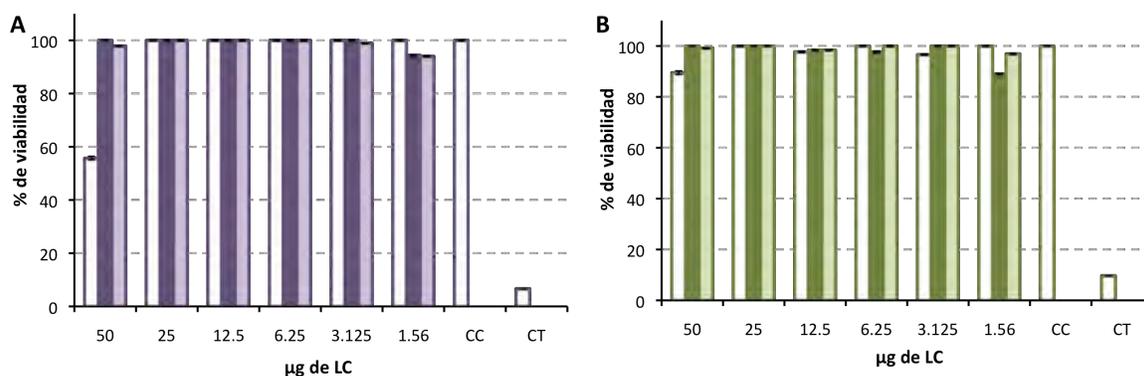


Figura 10. Viabilidad de las líneas celulares MDBK (A) y BHK-21 (B) con distintas cantidades de líquido celómico (LC, barras blancas); SN de 56° C (barras color oscuras) y SN de 72° C (barras color claro). CC, control de células (sólo medio); CT, control de toxicidad. La cantidad de LC ensayada se indica en el eje de las abscisas. Los ensayos se realizaron por duplicado.

### *Actividad antiviral del líquido celómico (LC) en contra del virus Aujeszky y el virus de la rabia*

En el caso del virus Aujeszky, el control de virus formó 63 placas líticas por pozo (promedio de tres ensayos) y cuando se le agregaron 33 µg de LC se logró una inhibición del 57% (figura 11). En el caso del virus de la rabia, con 21 µg se inhibió el 93% de la infección de las células, lo que equivale a menos 0.5 UI/ml y con 31 µg de LC el porcentaje de inhibición fue mayor al 93% logrando así 0.8 UI/ml (nivel mayor al mínimo establecido por la OMS) (figura 11).

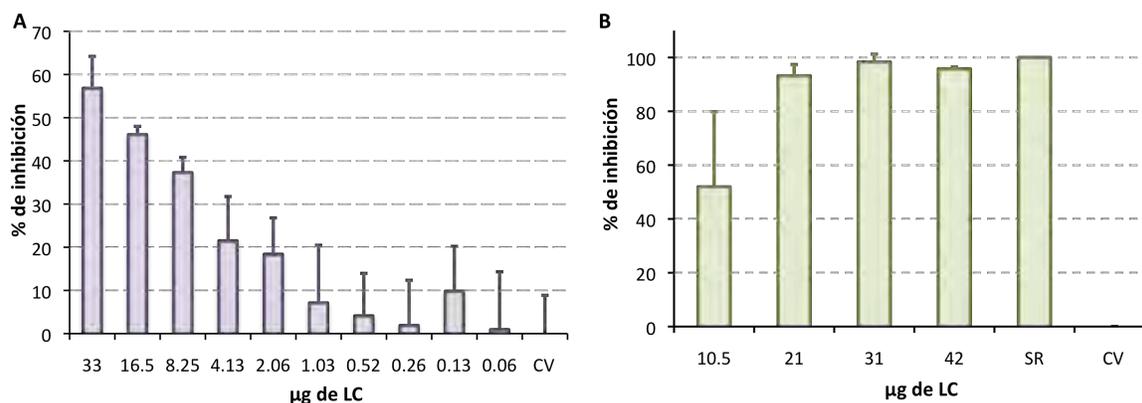


Figura 11. Efecto del líquido celómico (LC) del erizo de mar (*Tripneustes depressus*) en contra del virus Aujeszky (A) y el virus del rabia (B). Se probaron diferentes concentraciones de LC (µg). CV, control de virus; SR, suero de referencia. Los ensayos se hicieron por triplicado.

#### *Efecto de la temperatura sobre la actividad antiviral del líquido celómico*

El LC original tiene actividad antiviral pero fue tóxico para las líneas celulares en concentraciones mayores a 25 µg/ µl, esta toxicidad se eliminó calentado el LC a 56° y 72° C; por lo que también se probó si este tratamiento afecto la actividad antiviral del LC. Como se puede observar en la figura 9, en los carriles 4 al 7 existen algunas diferencias en el patrón de bandas entre los sobrenadantes (carriles 4 y 6) y los precipitados a ambas temperaturas (carriles 5 y 7).

En la figura 12 se observa que el efecto antiviral es termoestable, es decir se conserva en los SNs de ambas temperaturas (56° y 72° C). Para el virus Aujeszky se logró hasta un 72% de inhibición en los SNs , mientras que los PP inhiben sólo el 30% en el caso de 56° C y 21% para 72° C, este efecto puede ser residual, ya que al separar las dos fases aunque se realiza con cuidado siempre se quedan, aproximadamente, entre 10 y 15 µl junto con el

botón (figura 12 y 14A). La inhibición observada con el LC, SN56 y SN72 fue significativa compara con el PP72 ( $p < 0.001$ ), mientras que con el PP56 no fue así.

En contra del virus de la rabia el efecto fue más claro, ya que los SNs de 56° y 72° C, conservaron el mismo nivel de inhibición que el LC (97%) (figura 13 y 14B). Cuando se calcularon las UI se encontró que el SN72 se tenía un mayor nivel de neutralización 0.4 UI/ml, mientras que SN56 mostró sólo 0.3 UI/ml. El efecto de inhibición de los precipitados fue casi nulo para las dos muestras (6 y 1% a 56° y 72° C, respectivamente ó 0 UI/ml para ambos casos). En este caso las diferencias entre el LC, SN56 y SN72 comparada con ambos precipitados fue significativa ( $p < 0.001$ ) (figura 14B).

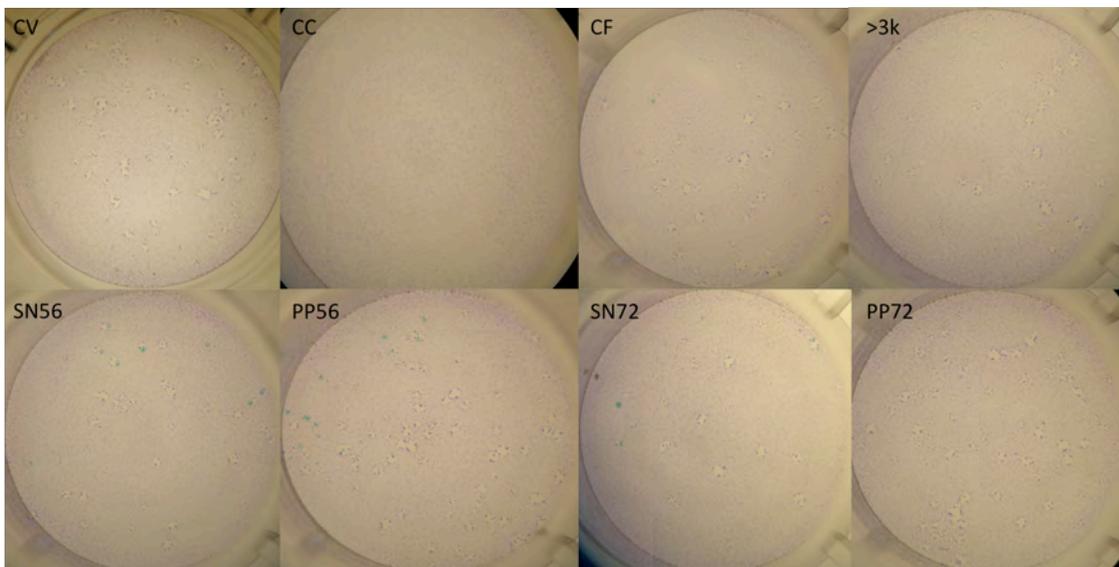


Figura 12. Fotografías de la inhibición de la formación de placas del virus Aujeszky sobre las células MDBK por el líquido celómico (LC), la fracción concentrada (>3k) y las fracciones resultado de la inactivación por calor a 56° C (SN56 y PP56) y 72° C (SN72 y P72).

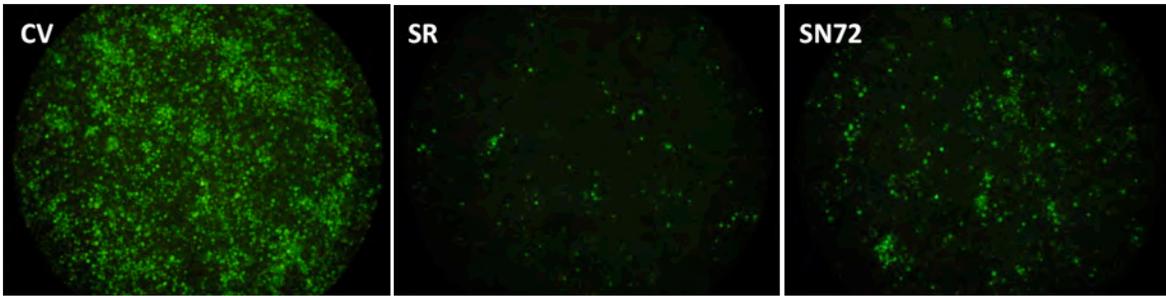


Figura 13. Fotografías de los focos fluorescentes que formados por el virus de la rabia en las células BHK-21 y su inhibición por el sobrenadante del líquido celómico inactivado (SN72). CV, control de virus; SR, suero de referencia.

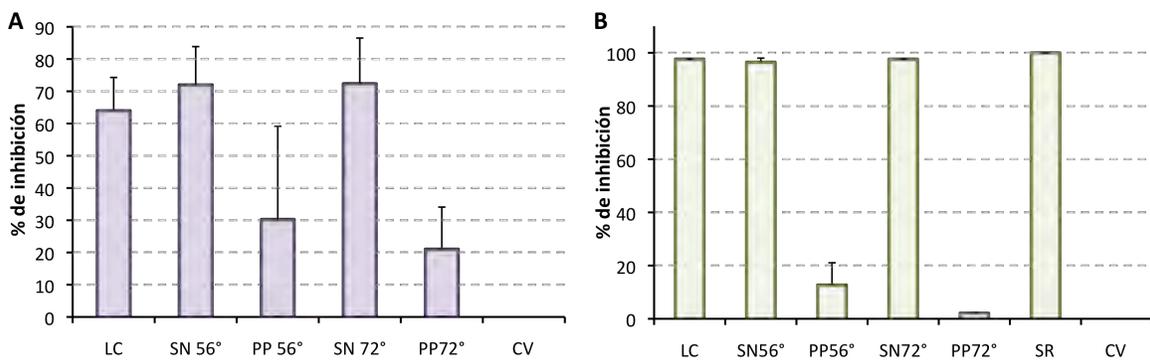


Figura 14. Efecto antiviral del los sobrenadantes (SNs) y precipitados (PPs) del líquido celómico (LC) expuesto a 56° durante 30' ó 72° C durante 20'. **A**, efecto contra virus Aujeszky; CV, control de virus. **B**, efecto contra el virus de la rabia. SR, suero de referencia.

#### *Determinación del momento del ciclo viral en el cual actúa el líquido celómico*

Para empezar a dilucidar como el LC inhibía la infección del virus en las células, se hicieron distintas incubaciones (combinando los componentes). El mejor efecto se encontró cuando se incubaba primero el LC con el virus (neutralización) por una hora y después se agrega a las células. Para el virus Aujeszky se encontró que el tratamiento de neutralización inhibía hasta en un 68% la infección de las células, mientras que con los tratamientos de pre- y post-infección se observó sólo un 0 y 8%, respectivamente; además

la diferencia en la formación de placas líticas entre la neutralización y los tratamientos de pre- y post-infección fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) (figura 15 y 16A).

Para el virus de la rabia el caso fue el mismo, la mejor inhibición se encontró cuando se neutraliza el virus (68% de inhibición, 0.6 UI/ml) en contra de 24% o 8% para pre- y post-infección, respectivamente (0 UI/ml) y la diferencia entre la neutralización y los tratamientos pre- y post-infección fue significativa ( $p < 0.05$ ) (figura 16B). Con esto se concluye que el LC se está uniendo al virus o neutralizándolo es decir, actúa en los primeros momentos de la infección impidiendo la entrada del mismo a las células.

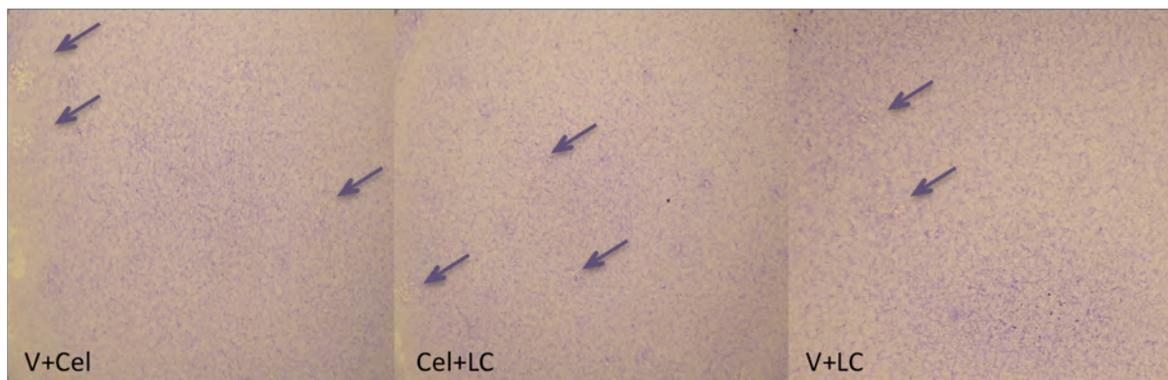


Figura 15. Fotografía de las placas líticas formadas por el virus Aujeszky en las células MDBK. V+Cel, post-infección; Cel+LC, pre-infección y V+LC, neutralización. V, virus; Cel, células, LC, líquido celómico. Las flechas señalan algunas de las placas líticas en los pozos.

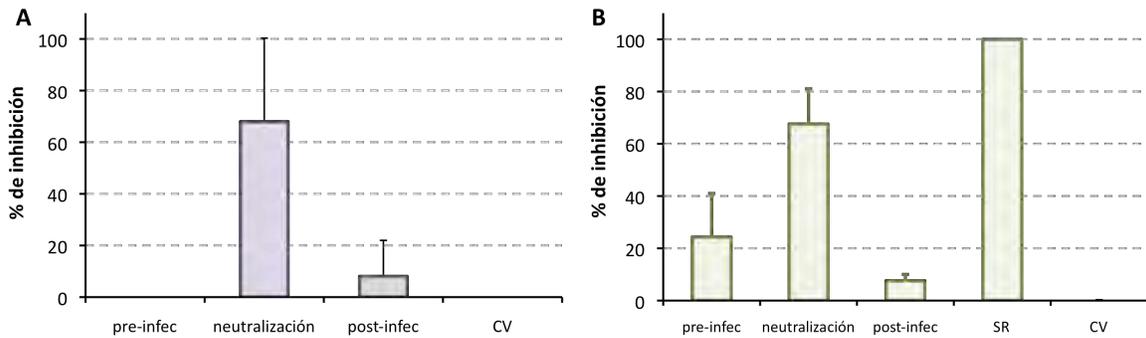


Figura 15. Momento de acción del LC en contra de los virus **(A)** Aujeszky y **(B)** de la rabia. En el eje de las abscisas se muestra el tratamiento y el eje de las ordenadas el porcentaje de inhibición. Pre-infec, pre-infección; post-infec, post-infección; CV, control de virus; SR, suero de referencia.

*¿El líquido celómico necesita estar presente en la solución o tiene un efecto tipo “inmunomodulador”?*

Se determinó si el efecto del LC es directo (necesita estar presente en la solución con el virus y las células) o si el LC es capaz de estimular a las células a que produzcan alguna otra molécula (tipo interferón) que sea el que inhiba la infección (efecto tipo “inmunomodulador” o indirecto). Se encontró que el efecto del LC es directo, es decir necesita estar en la solución, tanto para el virus Aujeszky como para el virus de la rabia. En la figura 17A se puede observar que con la presencia del LC se inhibe hasta un 74% la infección de las células, mientras que con los sobrenadantes del LC (SN LC) y del control de células (SN CC) se observó menos del 10% de inhibición ( $p < 0.001$ ).

En el caso del virus de la rabia el efecto fue el mismo, mostrando un 99% de inhibición en presencia del LC (0.7 UI/ml), sólo que con el SN LC se encontró un 73% de inhibición (0.3

UI/ml) y con el SN CC se mostró un 55% de inhibición (0.1 UI/ml). La diferencia en el efecto de inhibición en estas muestras sólo fue significativa entre el SN CC y el LC o SR (figura 17B).

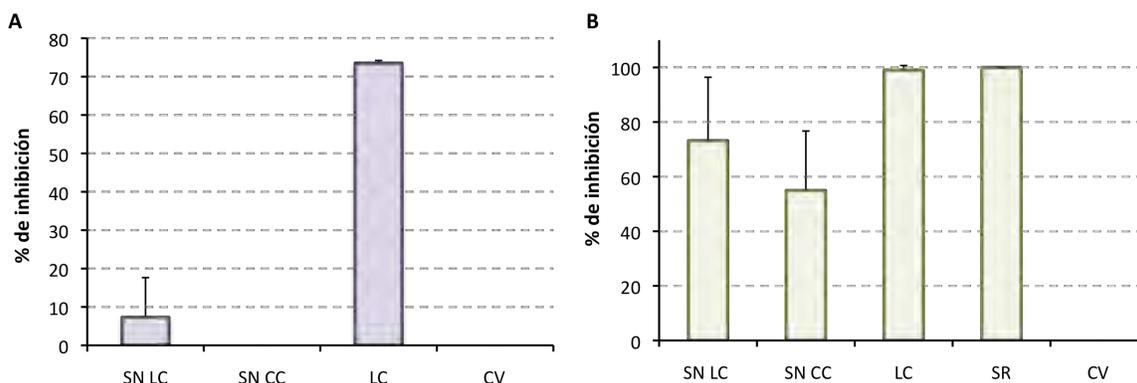


Figura 17 . Efecto antiviral del líquido celómico (LC) o del sobrenadante de células expuestas a LC (SN LC). **A**, en contra del virus Aujeszky; SN CC, es el control de medio de las células; CV, control de virus. **B**, en contra del virus de la rabia. SR, suero de referencia.

#### *Separación de la fracción de líquido celómico con la actividad antiviral*

##### *Precipitación con sulfato de amonio*

Una de las técnicas que se ensayaron para empezar a fraccionar el líquido celómico y conocer cual era la fracción con actividad antiviral fue la precipitación con distintas concentraciones de sulfato de amonio. En este caso, se hicieron tres precipitaciones seriadas del 40 al 50% de saturación de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , sin embargo para ninguno de los virus (Aujeszky y rabia) se logró determinar una fracción en la cual se conservara el efecto inhibitorio (figura 18). Por el contrario, parecía que había un barrido en la actividad antiviral en todas las muestras, mostrando todas las fracciones inhibición pero en menor

grado que la muestra original e incluso el efecto en contra del virus de la rabia variaba mucho entre un ensayo y otro, haciendo muy variables los valores de inhibición entre una prueba y otra (figura 18B).

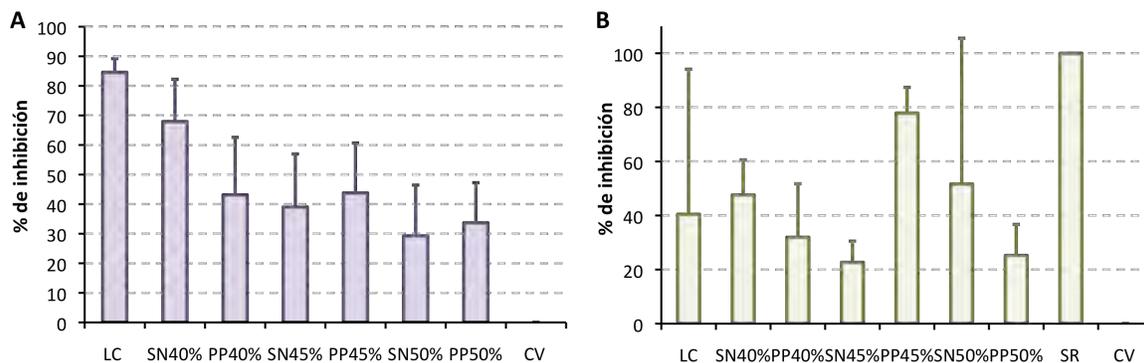


Figura 18. Inhibición obtenida con las fracciones de líquido celómico (LC) obtenidas por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a distintas concentraciones. **A)** efecto en contra del virus Aujeszky y **B)** en contra del virus de la rabia. SN, sobrenadante; PP, precipitado; CV, control de virus; SR, suero de referencia.

### *Cromatografía de filtración molecular*

Como otra aproximación para separar los componentes del líquido celómico y también tratando de obtener más cantidad de muestra en la fracciones colectadas se inició la separación en columna de filtración molecular. Se empleó una columna Superdex 200 HR 10/30, la cual puede separar moléculas de peso molecular entre un rango de 10 000 a 600 000. En la figura 19A se muestra el perfil cromatográfico de la corrida de calibración con un coctel de proteínas de peso molecular conocido, esto nos sirvió de referencia para estimar el peso molecular de los picos que se observen cuando se corra el líquido celómico.

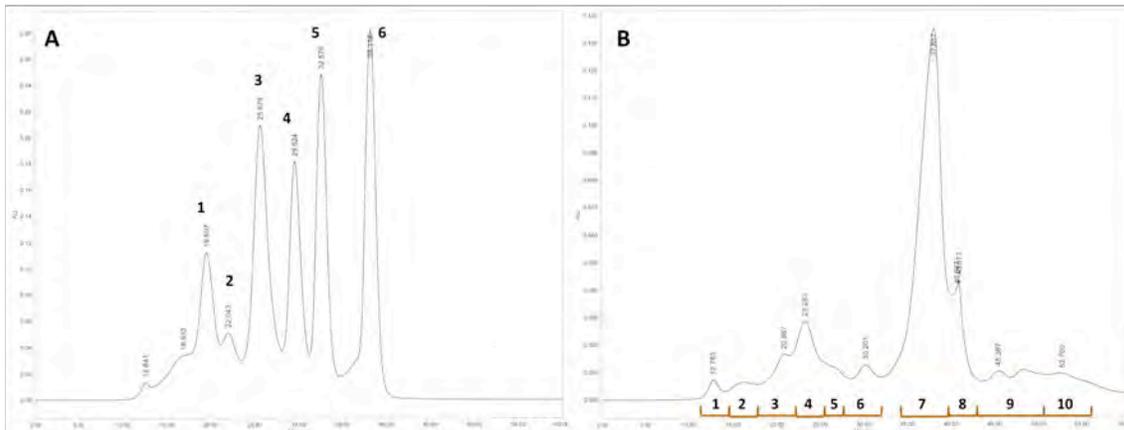


Figura 19. Cromatogramas obtenidos de la separación por filtración molecular del líquido celómico (LC) con columna Superdex 200 HR 10/30. **A**, perfil obtenido con el coctel de referencia (BioRad®); 1, tiroglobulina (PM 669 000); 2, IgA (PM 170 000); 3, IgG (PM 150 000); 4, ovoalbumina (PM 43 000); 5, mioglobulina (PM 17 600) y 6, vitamina B12 (PM 1 355). **B**, perfil obtenido con el LC (1.4 mg), los números abajo muestran como se separaron los picos.

Quando se inyectó el LC (1.4 mg aproximadamente) se obtuvo el perfil cromatográfico que se muestra en la figura 19B, aunque se colectaron fracciones de 1 ml después se combinaron como se muestra en parte de abajo del cromatograma, para poder separar los picos en un solo tubo cada uno. Considerando el tiempo de salida de los picos de referencia (figura 19A) las fracciones 1 y 2 del LC (Figura 19B) contienen proteínas con un peso molecular (PM) >669 000 (tiroglobulina pico 1, 19A); la fracción 3 tiene aproximadamente un PM de 669 000. La fracción 4 entre 600 000 y 150 000; la fracción 5 tiene un PM de aprox. 65 000; la 6 tiene un PM de alrededor de 43 000. La fracción 7 es al parecer la más abundante y se estima un PM de 1 500, semejante al pico 6 de la vitamina B12 (figura 19A). Las fracciones 8, 9 y 10 contienen péptidos o moléculas menores a 1 355 de peso molecular (figura 19B).

De los 10 picos o fracciones obtenidas se corrió un SDS-PAGE al 12.5% y se tiñó con nitrato de plata, porque este método de revelado es más sensible (detecta de 2-5 ng por banda de proteína) (figura 19). Así se lograron distinguir las bandas de cada pico, sin embargo no se lograron hacer ensayos de actividad antiviral por que no contenían la cantidad mínima que se requiere (al menos 31  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).

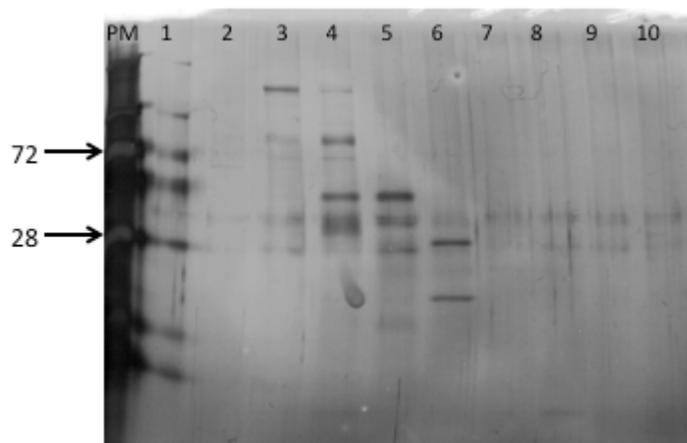


Figura 20. SDS-PAGE al 12.5% de las fracciones del líquido celómico obtenidas por filtración molecular. El gel se tiñó con nitrato de plata. PM, peso molecular (Fermentas, #SM1811). Los números de la parte superior corresponde a cada uno de los picos colectados y marcados en la figura 22B. Las flechas en la parte de la izquierda señalan dos de los pesos moleculares (kDa) que se distinguen claramente.

## Discusión

En este trabajo se observó que el líquido celómico del erizo de mar, *Tripneustes depressus* tiene actividad antiviral, este efecto fue demostrado *in vitro* en contra del virus Aujeszky (DNA de doble cadena) y el virus de la rabia (RNA de cadena sencilla y polaridad negativa).

Existen pocos reportes sobre la composición bioquímica del líquido celómico de los erizos de mar. Un estudio en el 2006 (54) determinó los niveles de componentes nitrogenados

en las gónadas y el líquido celómico del erizo de mar, *Paracentrotus lividus* y en el LC en reportó 90  $\mu\text{mol/l}$  de aminoácidos libres, 1.5  $\mu\text{mol/l}$  de trimetilamina y 1.9  $\mu\text{mol/lgr}$  de amonio ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ) en los erizos recién capturados. En nuestro caso la prueba para detección de nitrógeno ureico es menos sensible (sólo reportamos  $<3 \text{ mg/dL}$ ) y no discrimina entre estos compuestos nitrogenados, por lo que la comparación es difícil y necesitamos hacer determinaciones más precisas. En lo que respecta la pH del líquido celómico, en el mismo estudio hecho por Arafa y colaboradores (54) encuentran valores de pH entre 7.43 y 7.78, lo que coincide con el valor de 7.4 que observamos en el líquido celómico de *Tripneustes depressus*.

Se sabe que algunas moléculas tales como metabolitos secundarios de animales, plantas y algas tienen actividad en contra de algunos virus. Un ejemplo de estas son el Gymnocromo D y el Isogymnocromo D, ambos aislados del un crinoideo (*Gymnocrinus richeri*), los cuales tienen una potente actividad en contra del virus dengue, reportándose un efecto de reducción de focos con dosis menores a 1  $\mu\text{g/ml}$  ( $<0.89 \text{ nM}$ ) (55). En el caso del líquido celómico de *T. depressus*, son necesarios aproximadamente 30  $\mu\text{g}$  para reducir la infección viral más de un 50%, tanto para el virus Aujeszky como para el virus de la rabia (figura 10). Si comparamos estos dos estudios debemos tener en cuenta el hecho de que los gymnocromos son moléculas purificadas y el LC es una solución que contiene distintas moléculas, lo cual interfiere en dos cosas, principalmente: i) el efecto en contra de los virus y ii) cuando se hace la cuantificación y en los ensayos se considera que hay 3.072  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  que son proteínas totales y no sólo la moléculas que tiene el efecto antiviral.

Pan y colaboradores (41) reportaron que una molécula de 440 kDa aislada del cangrejo azul (*Callinectes sapidus*) tiene efecto en contra el virus Sindbis y demostraron que ésta actúa sobre la adherencia del virus a la célula. Este mecanismo puede ser el mismo que se este observando en el efecto del líquido celómico, ya que la mejor inhibición se encontró cuando el LC y el virus se incuban primero (neutralización) antes de ser agregado a las células (figura 15). Roch y colaboradores (42) reportan este mismo efecto, cuando emplean fragmentos de defensina de mejillón, encuentran la mejor inhibición en las mismas condiciones e incluso su acción mejora cuando se modifica la molécula para que aumente su carga positiva neta. Esta última característica (carga positiva neta) esta bien documentada en el grupo de los AMPs (56), ya que con esta carga positiva los AMPs pueden interactuar o unirse a las membranas celulares y virales (las cuales naturalmente tienen una carga neta negativa) y así bloquea la adherencia entre ellos. Otro estudio que apoya esta hipótesis es el previamente reportado por nuestro grupo (37) en el cual la actividad en contra del baculovirus AcNPV-GFP de un polipéptido aislado de la langostilla (*P. planipes*) también mostró la mejor inhibición cuando el polipéptido y el virus eran incubados antes de agregarse a las células, que es justo el mismo caso y se puede especular que estas moléculas actúan en la unión virus-células, por desestabilización o bloqueo de receptores, aunque para confirmar esto hacen falta más estudios.

Por otro lado Olicard y colaboradores (45) demuestran que la hemolinfa de las ostras, *Crassostrea gigas*, tiene actividad en contra del VHS-1 y el IPNV *in vitro* y que para inhibir el 50% el efecto citopático se necesitan 425 µg/ml y 156 µg/ml (proteínas totales), respectivamente. Comparando con la cantidad de LC (en proteínas totales) que se usó

para inhibir tanto el virus Aujeszky como el virus de la rabia, en este estudio se está agregando de 5 a 10 veces más la cantidad (proteínas totales), sin embargo esta cantidad se espera disminuir cuando se purifique el componente responsable de la actividad antiviral, ya que se eliminará cualquier otro componente que pueda interferir en el efecto. En este mismo estudio (45) también se menciona que la hemolinfa de la ostra tiene un mejor efecto cuando se agrega durante las dos primeras horas de la infección actuando quizá durante el proceso de adsorción celular; el LC como se mencionó antes tiene un efecto tipo “neutralización”, ya con las pre-incubaciones (1 hora) no se observa una disminución de la infección (fig. 15). Otro dato a mencionar en este mismo trabajo es el hecho de que la hemolinfa de la ostra necesita estar presente en la solución (junto con las células y el virus) para tener efecto sobre la infección, en el caso del LC también debe de estar presente (efecto directo) (fig.16) para tener efecto, pero en este caso sólo es necesario estar en contacto con el virus.

En el estudio realizado por Dang y colaboradores (44) se demostró la actividad antiviral de la hemolinfa de diferentes poblaciones de abulon, encontrando una alta variabilidad entre individuos y una mejor actividad antiviral en los organismos silvestres. En nuestro trabajo se eliminó la variabilidad entre individuos al hacer desde el inicio de la toma del LC un solo lote y tratarlo todo del mismo modo, por lo que estas variaciones no las observamos. En lo que respecta a la diferencia entre organismos cultivados o silvestres Dang y colaboradores (44) atribuyen este efecto a la diferencias en la alimentación, ya que los organismos silvestres se alimentan de algas y de ellas se han aislado algunos componentes con actividad antiviral; esta hecho también se debe de considerar en nuestro estudio, ya que

las algas también son parte de la dieta de los erizos, por lo que se deben de realizar más estudios para conocer la naturaleza del inhibidor. Por otro lado, en el mismo estudio se hace referencia a un estudio previo, en donde se mencionan que quizá el componente activo de la hemolinfa de abulon sea un azúcar, un ácido o pequeños péptidos polares resistentes al calor; esta observación se puede comparar con el efecto que nosotros observamos en el LC cuando calentamos hasta 72° C y conservamos la actividad antiviral, por lo que quizá la naturaleza del inhibidor sea semejante a lo encontrado en la hemolinfa del abulon.

El hecho de que el LC inactivado o fracción termoestable no afecte viabilidad en las líneas celulares empleadas en este estudio (MDBK y BHK-21) es una característica a destacar, ya que uno de los grandes problemas que enfrenta el desarrollo de nuevos fármacos antivirales es la toxicidad. La importancia de esta característica también se resalta en el estudio de Defer y colaboradores (2009), donde prueban los extractos ácidos de cinco moluscos y tres de ellos tienen un alto efecto antiviral en contra del virus *Herpes simplex* tipo 1, sin embargo dos de los extractos presentaron una alta toxicidad en la línea celular (VERO) en la que se realizaron los ensayos (48).

El aislamiento y caracterización de nuevas moléculas antivirales extraídas de invertebrados es importante, ya que nos puede ayudar a desarrollar modelos para el diseño de nuevos fármacos. Podemos aprender mucho de los animales invertebrados, ya han existido en la Tierra por más tiempo y han estado en contacto con miles de virus por lo que han desarrollado diferentes estrategias para poder sobrevivir hasta nuestros días.

## **Conclusión**

El líquido celómico del erizo de mar, *Tripneustes depressus* inhibe la infección *in vitro* del virus Aujeszky y el virus de la rabia, este efecto se conserva aún cuando se expone el LC a 72° C durante 20' (termoestable). El LC tiene un efecto directo, es decir necesitan estar presente en la solución junto con el virus y al parecer puede interferir en la unión virus-célula para bloquear así la infección celular (neutralización).

## Literatura citada

1. Iwanaga S, Luel LB. 2005. Recent advances in the innate immunity of the invertebrate animals. *J Biochem Mol Biol.* 2: 128-150.
2. Cuthbertson BJ, Büllsbach EE, Fievet J, Brachère E, Gross PS. 2004. A new class (penaeidin class 4) of antimicrobial peptides from the Atlantic white shrimp (*Litopenaeus setiferus*) exhibits target specificity and an independent proline-rich-domain function. *Biochem J.* 381: 79-86.
3. Brusca RC, Brusca GJ. **Invertebrates.** 2003. 2a ed. 895 pp
4. Rast JP, Pancer Z, Davidson EH. 2000. New approaches towards an understanding of deuterostome immunity. **In:** Du Pasquier L, Litman GW, eds. Origin and evolution of the vertebrate immune system. pp. 384
5. Brockton V, Henson JH, Raftos DA, Majeske1 AJ, Kim Y-O, Smith LC. 2008. Localization and diversity of 185/333 proteins from the purple sea urchin – unexpected protein-size range and protein expression in a new coelomocyte type. *J Cell Sci.* 121: 339-348.
6. Smith LC, Ghosh J, Buckley KM, Clow LA, Dheilily NM, Haug T, *et al.* 2010. Echinoderm Immunity. **In:** Söderhäll ed. Invertebrate Immunity. 301pp
7. Rast JP, Smith LC, Loza-Coll M, Hibino T, Litman GW. 2006. Genomic insights into the immune system of the sea urchin. *Science.* 314: 952-956.
8. Al-Sharif WZ, Sunyer JO, Lambris JD, Smith LC. 1998. Sea urchin coelomocytes specifically express a homologue of the complement component C3. *J Immunol.* 160: 2983-2997.

9. Berthuessen K. 1982. Receptors for complement on echinoid phagocytes. II. Purified human complement mediates echinoid phagocytosis. ***Dev Comp Immunol.*** 6: 635-642.
10. Smith LC, Chang L, Britten R J, Davidson EH. 1996. Sea urchin genes expressed in activated coelomocytes are identified by expressed sequence tags. Complement homologues and other putative immune response genes suggest immune system homology within the deuterostomes. ***J Immunol.*** 156: 593-602.
11. Smith LC, Shih C-S, Dachenhausen S. 1998. Coelomocytes specifically express SpBf, a homologue of factor B, the second component in the sea urchin complement system. ***J Immunol.*** 161: 6784-6793.
12. Clow LA, Raftos DA, Gross PS, Smith LC. 2004. The sea urchin complement homologue, SpC3, functions as an opsonin. ***J Exp Biol.*** 207: 2147- 2155.
13. Kerlin RL, Cebra JJ, Weinstein PD, Prendergast RA. 1994. Sea star factor blocks development of T-dependent antibody secreting clones by preventing lymphokine secretion. ***Cell Immunol.*** 156: 62-76.
14. Hibino T, Loza-Coll M, Messier C, Majeske AJ, Cohen AH, Terwilliger DP et al. 2006. The immune repertoire encoded in the purple sea urchin genome. ***Dev Biol.*** 300: 349-365.
15. Ramírez-Gómez F, Aponte-Rivera F, Méndez-Castener L, García-Arrarás JE. 2010. Changes in holothurian coelomocyte populations following immune stimulation with different molecular patterns. ***Fish Shellfish Immunol.*** 29: 175-185.

16. Dheilly NM, Haynes PA, Bove U, Nair SV, Raftos DA. 2011. Comparative proteomic analysis of the sea urchin (*Heliocidaris erythrogramma*) antibacterial response revealed the involvement of apextrin and calreticulin. **J Invert Pathol.** 106: 223-229.
17. Mokhlesi A, Saeidnia S, Gohari AR, Shahverdi AR, Nasrolahi A, Farahani F et al. 2012. Biological activities of the sea cucumber *Holothuria leucospilota*. **Asian J Animal Vet Advances.** 7: 243-249.
18. Sea Urchin Genome Sequencing Consortium. 2006. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. **Science.** 314: 941-952.
19. Kumar JR, Zi-rong Xu. 2004. Biomedical compounds from marine organisms. **Marine Drugs.** 2: 123-146.
20. Nauwynck H, Glorieux S, Favoreel H, Pensaert M. 2007. Cell biological and molecular characteristics of pseudorabies virus in cell cultures and in pigs with emphasis on the respiratory tract. **Vet Res.** 38: 229-241.
21. Pomeranz LE, Reynolds AE, Hengartner CJ. 2005. Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurobiology and veterinary medicine. **Microbiol Mol Biol Rev.** 69: 462-500.
22. Tordo N. 1993. Rhabdoviruses: virus de la rage. **In: Virologie Medicales.** Ed. R Crainic, Nicolas J-C. France. 317-333.
23. Schnell MJ, McGettigan JP, Wirblich C, Papaneri A. 2010. The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. **Nature Rev.** 8: 51-61.
24. Lafon M. 2005. Rabies virus receptors. **J Neurovirol.** 11: 82-87.

25. Balseiro P, Falcó A, Romero A, Dios S, Martínez-López A, Figueras A, Estepa A, Novoa B. 2011. *Mytilus galloprovincialis* Mytacin C: A chemotactic molecule with antiviral activity and immunoregulatory properties. **PLoS ONE**. 6: e23140
26. De Clercq E. 1982. Specific targets for antiviral drugs. **Biochem Immunol**. 205: 1-13.
27. Bean B. 1992. Antiviral therapy: current concepts and practices. **Clin Microbiol Rev**. 5: 146-182.
28. Ourth DD, Renis HE. 1993. Antiviral melanization reaction of *Heliothis virescens* hemolymph against DNA and RNA viruses *in vitro*. **Comp Biochem Physiol B**. 105: 719-23.
29. Popham HJR, Shelby KS, Brant SL, Coudron TA. 2004. Potent virucidal activity in larval *Heliothis virescens* plasma against *Helicoverpa zea* single capsid nucleopolyhedrovirus. **J Gen Virol**. 85: 2255-2261.
30. Greco KN, Mendonça RMZ, Moraes RHP, Mancini DAP, Mendonça RZ. 2009. Antiviral activity of the hemolymph of the *Lonomia obliqua* (Lepidoptera: Saturniidae). **Antiviral Res**. 84: 84-90.
31. Carballar-Lejarazú R, Rodríguez MH, de la Cruz Hernández-Hernández F, Ramos-Castañeda J, Possani LD, Zurita-Ortega M, Reynaud-Garza E, Hernández-Rivas R, Loukeris T, Lycett G, Lanz-Mendoza H. 2008. Recombinant scorpine: a multifunctional antimicrobial peptide with activity against different pathogens. **Cell Mol Life Sci**. 65: 3081-3092.

32. Chernysh S, Kim SI, Bekker G, Pleskach VA, Filatova NA, Anikin VB, Platonov VG, Bulet P. 2002. Antiviral and antitumoral peptides from insects. **PNAS**. 99: 12628-12632.
33. Julander JG, Judge JW, Olsen AL, Rosenberg B, Schafer K, Sidwell RW. 2007. Prophylactic treatment with recombinant *Eimeria* protein, alone or in combination with an agonist cocktail protects mice from Banzi virus infection. **Antiviral Res**. 75: 14-19.
34. Gowen BB, Smee DF, Wong MH, Judge JW, Jung KH, Bailey KW, Pace AM, Rosenberg B, Sidwell RW. 2006. Recombinant *Eimeria* protozoan protein elicits resistance to acute phlebovirus infection in mice but not hamsters. **Antimicrob Agents Chemother**. 50: 2023-2029.
35. Nakamura T, Furunaka H, Miyata T, Tokunaga F, Muta T, Iwanagall S. 1988. Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the Horseshoe Crab (*Tachypleus tridentatus*). **J Biol Chem**. 263: 16709-16713.
36. Morimoto M, Mori H, Otake T, Ueba N, Kunita N, Niwa M, Murakami T, Iwanaga S. 1991. Inhibitory effect of tachyplesin I on the proliferation of human immunodeficiency virus *in vitro*. **Chemotherapy**. 37: 206-211.
37. Galvez-Romero G, Salas-Rojas M, Hernández GM, Blanco-Favela F, Aguilar-Setián A. 2011. Anti-baculovirus activity in a protein extracted from the exoskeleton of *Pleuroncodes planipes* [Decapoda:Galatheide]. **Fish Shellfish Immunol**. 31: 482-484.

38. Galvez RG. 2004. Evaluación de la actividad antiviral innata amplia de extractos titulares de langostilla (*Pleuroncodes planipes*). **Licenciatura**. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 41 pp.
39. Destoumieux D, Bulet P, Loew D, Van Dorsselaer A, Rodriguez J, Bachère E. 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). **J Biol Chem**. 272 : 28398-406.
40. Rojtinnakorn J, Hirono I, Itami T, Takahashi Y, Aoki T. 2002. Gene expression in haemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach. **Fish Shellfish Immunol**. 13: 69-83.
41. Pan J, Kurosky A, Xu B, Chopra AK, Copenhaver DH, Singh IP, Baron S. 2000. Broad antiviral activity in tissues of crustaceans. **Antiviral Res**. 48: 39-47.
42. Roch P, Beschin A, Bernard E. 2004. Antiprotozoan and antiviral activities of non-cytotoxic truncated and variant analogues of mussel defensin. **eCAM**. 1: 167-174.
43. Roch P, Yang Y, Toubiana, Aumelas A. 2008. NMR structure of mussel mytilin, and antiviral-antibacterial activities of derived synthetic peptides. **Dev Comp Immunol**. 32: 227-238.
44. Dang VT, Speck P, Doroudi M, Smith B, Benkendorff. 2011. Variation in the antiviral and antibacterial activity of abalone *Haliotis laevis*, *H. rubra* and their hybrid in South Australia. **Aquaculture**. 315: 242-249.
45. Olicard C, Renault T, Torhy C, Benmansour A, Bourgougnon N. 2005. Putative antiviral activity in hemolymph from adult pacific oysters, *Crassostrea gigas*. **Antiviral Res**. 66: 147-152.

46. Lee T-G, Maruyama S. 1998. Isolation of HIV-1 protease-inhibiting peptides from thermolysin hydrolysate of oyster proteins. **Biochem Biophys Res Comm.** 253: 604-608.
47. Bachère E, Hervio D, Mialhe E, Grizel H. 1990. Evidence of neutralizing activity against T3 coliphage in oyster *Crassostrea gigas* hemolymph. **Dev Comp Immunol.** 14: 261-268.
48. Defer D, Bourgoignon N, Fleury Y. 2009. Screening for antibacterial and antiviral activities in three bivalve and two gastropod marine molluscs. **Aquaculture.** 293: 1-7.
49. Mena JA, Ramírez TO, Palomares LA. 2003. Titration of non-occluded baculovirus using a cell viability assay. **Biotechniques.** 34: 260-264.
50. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem;** 72: 248-254.
51. Mahy BWJ. 1991. Virology a practical approach. **IRL Press.** 264 pp.
52. Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H. 1996. Laboratory techniques in rabies. 4a Ed. **World Health Organization.** Geneva. 493 pp.
53. Segel IH. 1976. Biochemical calculations. 2<sup>a</sup> Ed. **John Wiley and Sons.** New York. 400 pp.
54. Arafa S, Sadok S, El Abed A. 2006. Variation in nitrogenous compounds and gonad index in fed and starved sea urchins (*Paracentrotus lividus*) during live storage. **Aquaculture.** 257: 525-533.

55. Laille M, Gerald F, Debitus C. 1998. In vitro antiviral activity on dengue virus of marine natural products. **CMLS Cell Mol Life Sci.** 54: 167-170.
56. Bulet P, Stöcklin R, Menin L. 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunol Rev.** 198: 169-184.



Contents lists available at ScienceDirect

## Fish &amp; Shellfish Immunology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/fsi](http://www.elsevier.com/locate/fsi)

Full length article

## The coelomic fluid of the sea urchin *Tripneustes depressus* shows antiviral activity against Suid herpesvirus type 1 (SHV-1) and rabies virus (RV)



M. Salas-Rojas<sup>a,b</sup>, G. Galvez-Romero<sup>b</sup>, B. Anton-Palma<sup>c</sup>, R. Acevedo<sup>c</sup>, F. Blanco-Favela<sup>d</sup>, A. Aguilar-Setién<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Unidad de Investigación Médica en Inmunología, UMAE Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional "Siglo XXI", IMSS, México, Distrito Federal, México

<sup>b</sup> Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Distrito Federal, México

<sup>c</sup> Laboratorio de Neurobiología Molecular y Neuroquímica de Adicciones, Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz", México, Distrito Federal, México

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 27 August 2013

Received in revised form

24 October 2013

Accepted 25 October 2013

Available online 1 November 2013

## Keywords:

Sea urchin

Antiviral effect

Suid herpesvirus type 1

Rabies virus

## ABSTRACT

Several studies have reported that molecules extracted from invertebrates have activity against different viruses, even against those that do not infect these organisms in their environment. One of the main mechanisms against pathogens in these organisms is the production of antimicrobial peptides. The objective of this study was to determine whether the coelomic fluid (CF) of the sea urchin *Tripneustes depressus* has activity against Suid herpesvirus type 1 (SHV-1) and/or rabies virus (RV). We tested the antiviral activity of CF in neutralizing assays and observed 50% inhibition against SHV-1 lytic plaque formation using 33 µg of CF, whereas 21 µg CF was sufficient to obtain more than 90% inhibition for RV. Cytotoxicity to MDBK and BHK-21 cells was found with whole CF yet was eliminated by heating at 56 or 72 °C (even when using 50 µg of heat-inactivated CF supernatant [SN or thermostable fraction]), and SN retained the antiviral effect. In both cases, the antiviral effect was direct and thermostable (SN 56 and 72 °C), and the best inhibition was observed when CF + virus was incubated prior to the addition of the cells. Therefore, the coelomic fluid of *T. depressus* has antiviral activity against SHV-1 and RV that is direct and stable at 72 °C. We suggest that further assays should be performed using more accurate methods to characterize new molecules with antiviral activity that may result in new drugs.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The defense system of invertebrates is innate and based on the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) [1], and the synthesis of antimicrobial peptides (AMPs) is one of the most important defense mechanisms in invertebrates. Indeed, these AMPs are vital components of the innate immune system in all multicellular organisms, functioning as immune effectors by killing or inhibiting the growth of their targets [1].

It has been estimated that approximately 41,000 AMPs are present in multicellular organisms [1]. Several molecules with antiviral activity have been isolated from marine invertebrates,

such as horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) tachyplestin, a molecule that has activity against type A influenza virus and vesicular stomatitis virus (VSV) [2]. A 440 kDa fraction from blue crab (*Callinectes sapidus*) tissue extract was found to inhibit different viruses, with the best effect against Sindbis virus (SV) [3]. Two defensin fragments from the mussel *Mytilus galloprovincialis* reportedly reduced human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection up to 70% in MAGIC-5B cells, though this effect was only observed when the fragments were preincubated with the virus [4]. Another two molecules isolated from *M. galloprovincialis* are mytilin and myticin; mytilin can inhibit white spot syndrome virus (WSSV) *in vitro*, and the myticin was tested against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) and infectious necrosis pancreatic virus (IPNV), with 85% and 75% inhibition, respectively [5,1]. Hemolymph from the abalones *Haliotis laevigata* and *Halocardina rubra* exhibits an effect against herpes simplex virus type 1 (HSV-1), and the activity was stronger when the hemolymph was obtained from wild animals [6]. Activity against HSV, IPNV, HIV-1, and T3 coliphage has also been reported for hemolymph from the oyster

\* Corresponding author, Unidad de Investigación Médica en Inmunología, UMAE Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional "Siglo XXI", Instituto Mexicano del Seguro Social, Av. Cuauhtémoc 330 Col. Doctores, 06720 México, Distrito Federal, México. Tel.: +52 55 56276943.

E-mail address: [est1911@hoymail.com](mailto:est1911@hoymail.com) (A. Aguilar-Setién).

*Crassostrea gigas* [7–9]. Additionally, a peptide with *in vitro* antiviral activity against AcNPV baculovirus was isolated from red crab (*Pleuroncodes planipes*) exoskeleton extracts, and its function against other viruses is being studied [10]. Furthermore, hemolymph from five mollusk species was tested *in vitro* against HSV-1; the acidic extract from common cockle (*Cerastoderma edule*) was found to be the most active fraction, whereas fractions from oyster (*Ostrea edulis*) and common whelk (*Buccinum undatum*) presented a high inhibition but also high cytotoxicity [11].

Although there are studies regarding the immune system of Echinodermata and their response to bacterial or mechanic stimulus [12–19], investigations of their antiviral responses is not well described, even though the complete genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* has been published [20]. Nonetheless, as an antiviral response in Echinodermata, ten new saponins, named certonardosides A to J, were isolated from the starfish *Certonegaster semiregularis*, and their antiviral properties were tested against HIV, HSV, Coxsackievirus B, Encephalomyocarditis virus, and VSV, with only mild potency being observed for certonardosides I and J [21].

As described above, antiviral responses in echinoderms have not been thoroughly studied. However, considering that molecules with activity against virus as HIV, HSV and Influenza have been isolated from different invertebrates, mostly belonging to the Arthropoda Phylum, we considered that in echinoderms we could find this type of molecules, too. The objective of this study was to evaluate whether the coelomic fluid (CF) from the sea urchin *Tripeustes depressus* exhibits activity against vertebrate viruses, specifically against Suid herpesvirus type 1 (SHV-1; a DNA virus) and rabies virus (RV; a RNA virus).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Collection area and coelomic fluid (CF) sampling

The collection area was in Ensenada de los Muertos, Baja California Sur, México. The sea urchins were collected individually by hand and were maintained in seawater until sampling. A syringe was introduced into the mouth, and 10 ml of coelomic fluid (CF) was extracted from each animal; the animals were returned to their environment after sampling.

The coelomic fluid was mixed and maintained at  $-20^{\circ}\text{C}$  until transported to the laboratory. CF was centrifuged for 10 min at  $2000 \times g$  and  $4^{\circ}\text{C}$ , and the supernatant was filtered through  $0.45 \mu\text{m}$  and  $0.20 \mu\text{m}$  membranes for sterilization. CF was stored in 50 ml aliquots at  $-70^{\circ}\text{C}$  until use. CF was concentrated by centrifugation using Amicon<sup>®</sup> Ultra 3K MWCO tubes (Millipore, UFC900324) at  $5000 \times g$  for 30 min at  $20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2. Heat inactivation

CF was inactivated by heating at  $56^{\circ}\text{C}$  for 30 min or  $72^{\circ}\text{C}$  for 20 min; the sample was then centrifuged for 10 min at  $11,200 \times g$  and  $4^{\circ}\text{C}$ . The supernatant (SN or thermostable fraction) and the precipitate (PP) were separated; the latter was resuspended in half of the initial volume (regardless of the amount) of PBS (pH 7.4). All the samples (whole CF, SNs and PPs from both temperatures) were tested for cell toxicity and antiviral activity against SHV-1 and RV. SDS-PAGE analyses and Bradford assays were also performed.

### 2.3. Cytotoxicity evaluation

The toxicity of the whole CF and thermostable fractions (SNs at both temperatures) were tested by the MTT test in accordance with Ména and collaborators [22]. In the assay, 8 twofold dilutions were performed, starting with  $50 \mu\text{g}$  of CF (whole or thermostable

fractions); 30,000 cells/well (96 well/plates) were then added. For the BHK-21 cells, the incubation period was 48 h and was 72 h for the MDBK cells (under the same infection conditions). The supernatant was discarded after incubation, and  $50 \mu\text{l}$  medium plus  $10 \mu\text{l}$  MTT was added to each well. The cells were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 2 h, and the supernatant was discarded;  $50 \mu\text{l}$  DMSO was added, and the plates were shaken for 20 min to dissolve the magenta-colored salt crystals. A microplate reader (DYNATHTEC MR 5000) was used to read the absorbance at 570 nm. The percentages of dead and live cells were compared to the controls (cellular control and toxicity control, MDBK or BHK-21 cells lysed with Triton 100X at 1% in PBS). The assay was performed in duplicate.

### 2.4. SDS-PAGE and Bradford assay

SDS-PAGE (12.5%) [23] was used to determine the composition of the proteins in the whole and concentrated CF and in the fractions obtained after heat inactivation (SN and PP) (see below); the proteins were stained with Coomassie Blue after electrophoresis. A Bradford [24] assay was performed to quantify the proteins in each sample. In cases in which protein detection was negative by the Bradford assay, the proteins in the samples were quantified by absorbance at 280 nm (UV light) using a biophotometer (Eppendorf).

### 2.5. Biochemical analysis

A biochemical analysis of CF was performed using a HITACHI P800 analyzer to determine the quantity of cholesterol, triglycerides, glucose, N urea, and different ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$ , and  $\text{Cl}^{2-}$ ) in the samples. CF pH was measured using a  $\phi 360$  pHmeter (Beckman<sup>®</sup>).

### 2.6. Cells and viruses

MDBK or NBL-1 (ATCC No. CCL-22) and BHK-21 (ATCC No. CCL-10) cells were used in this study. Both cell lines were maintained at  $37^{\circ}\text{C}$  in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere in Glasgow medium (Invitro SA; ME055) supplemented with an antibiotic-antifungal solution (1X) (Invitro SA; A07), 1.1% sodium pyruvate, 1.1% glutamine, and 2.5%  $\text{NaHCO}_3$  to adjust the pH to 7.4. The medium plus 10% FBS (GIBCO<sup>®</sup>; 16000-044) was used to propagate the cells; medium without serum was used for the infection assays and to propagate the virus.

SHV-1 Baria strain was propagated in the MDBK cells [25], and RV Pasteur strain was propagated in the BHK-21 cells [26]. In both cases, the supernatants from infected cells were clarified by centrifugation at  $2000 \times g$  for 15 min and stored in aliquots at  $-70^{\circ}\text{C}$ . The SHV-1 and RV stocks were titrated as previously described [25,26].

### 2.7. Viral inhibition test *in vitro*

SHV-1. A plaque inhibition test was performed to determine if CF possesses activity against SHV-1 [25]. A monolayer of MDBK cells was obtained in a 24-well plate (Corning<sup>®</sup>, 3471), and a mixture with  $63 \mu\text{g}/150 \mu\text{l}$  of CF + 80 plate forming units (PFUs) of SHV-1 was added to the cells. The plate was incubated for 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$  with 5%  $\text{CO}_2$ . After the supernatant was discarded, the cells were washed 3 times with PBS (pH 7.4), and 1 ml of Glasgow medium + 0.75% of carboxymethylcellulose sodium salt was added. The plate was incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$  for 72 h after which  $500 \mu\text{l}$  of 10% formaldehyde was added to each well; the plate was maintained at room temperature for 45 min. The formaldehyde/medium/carboxymethylcellulose was discarded, and the cells were stained for 15 min with 0.3% Crystal violet solution ( $500 \mu\text{l}/\text{well}$ )

and washed 3 times with tap water. After drying, the number of lysed cells per well were counted using a stereoscopic microscope (Stemi 2000, ZEISS). The assay was performed by triplicate.

RV. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) was performed to determine if CF has activity against rabies virus (26). Briefly, a threefold dilutions were performed, starting with 31 µg of CF. The dilutions were incubated with 30 FFUs of RV for 1 h at 37 °C in a 96-well plate (NUNC®, 167008). As reference serum, a human rabies immunoglobulin (Berirab® P) was used and it was adjusted to 10 International Units (IU)/ml. The BHK-21 cells were then added (30,000 cells/well), and the plate was incubated for 48 h. The supernatant was discarded, and 100 µl of acetone: ethylic alcohol (80:20) solution was added to fix the cells, which were incubated for 30 min at -20 °C. The solution was discarded and when it was dry; a FITC-conjugated anti-rabies monoclonal antibody was then added (55 µl/well) (1:64 in PBS 0.5% BSA) (FUJIREBIO Diagnostics, Inc). The plate was incubated for 45 min at 37 °C, and the antibody was discarded; 100 µl of mounting solution (glycerin: PBS, v/v at pH 8.3) was added. The plate was examined using an inverted microscope with a UV light (OLYMPUS, IMT-2), the focus forming units (FFUs) were counted and the neutralization level was calculated according to the WHO (26), which marks 0.5 IU/ml as a minimum level to consider a serum with protective antibodies levels. This test is recommended by the WHO to measure the neutralization of rabies virus. To determine the percentage of inhibition only the dilution 1:3 was used. The assay was performed in triplicate.

#### 2.8. Dose-response curve

A dose-response curve to evaluate the best amount of CF required to inhibit the virus was constructed. CF was diluted from 33 µg to 0.06 µg for SHV-1 and from 42 µg to 10.5 µg for RV. We performed the same tests described above for each dilution. The assay was performed three times for each virus.

#### 2.9. Determination of direct or indirect effects

To determine whether the effect of CF against the virus is direct (CF interacts directly with the cell or the virus) or indirect (CF stimulates the cell to produce molecules with an antiviral effect), the following assay was performed. In two 6-well plates (Corning®, 3473), 500 µl of CF was added over a cell monolayer that was previously washed twice with PBS (pH 7.4); both plates were incubated for one hour at 37 °C. The plates were again washed under the same conditions, and 2 ml of medium without serum was added per well and incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>, one plate for 72 h (SHV-1) and the other for 48 h (RV). A control (medium only) was included. The supernatants were recovered and stored in aliquots at -70 °C until use. A mixture of the MDBK cell supernatant (150 µl) + SHV-1 (80 PFUs) or BHK-21 cell supernatant (50 µl) + RV (30 FFUs) and their respective controls were incubated for 1 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. The mixtures were added to the cell monolayers. For RV, 50 µl of Glasgow medium without serum was added, and the plate was incubated for 48 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. For SHV-1, the plate was incubated for 1 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. The mixtures were discarded, and the cells were washed twice with PBS (pH 7.4). Lastly, 1 ml of Glasgow medium without serum + 0.75% carboxymethylcellulose sodium salt was added, and the plate was incubated for 72 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. The plates were examined as previously described. The assay was performed three times for each virus.

#### 2.10. Action moment

The following assays were performed to identify the exact moment at which CF inhibited SHV-1 or RV infection:

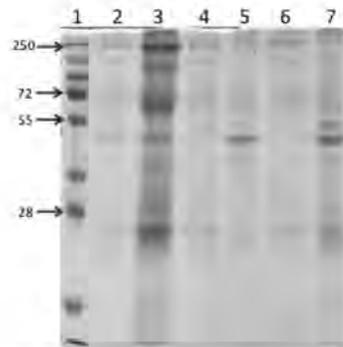


Fig. 1. 12.5% SDS-PAGE stained with Coomassie Blue. Lane: 1, MW (kDa) (Fermentas, #SM1811); 2, coelomic fluid (CF); 3, concentrated CF (membrane, 3K MWCO); 4, supernatant (SN) 56 °C; 5, precipitate (PP) 56 °C; 6, SN 72 °C; 7, PP 72 °C.

- i) *pre-infection*. CF was added to MDBK or BHK-21 cells and incubated for 1 h. CF was discarded, the virus (SHV-1 or RV) was added, and the cells were incubated for 1 h. Lastly, the virus was substituted with Glasgow medium, and the cells were incubated for 72 h for SHV-1 or 48 h for RV.
- ii) *co-infection or neutralization*. CF and the virus (SHV-1 or RV) were mixed and incubated for 1 h at 37 °C, and the mixture was added to cells. After incubating for 1 h, the mixture was substituted with Glasgow medium, and the cells were incubated for 72 h for SHV-1 or 48 h for RV.
- iii) *post-infection*. Virus (SHV-1 or RV) was incubated with MDBK or BHK-21 cells (respectively) for 1 h. The virus was discarded, and CF was added and incubated for 1 h. CF was then substituted with Glasgow medium, and the cells were incubated for 72 h for SHV-1 or 48 h for RV.

On day 3 for SHV-1 and day 2 for RV, the plates were examined for the particular virus, as described above. All the assays were performed three times for each virus with their respective positive and negative (cells without virus) controls.

#### 2.11. Statistical analyses

All data were subjected to analysis of variance (one-way ANOVA) and post-hoc Tukey Test using the Program of the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) v.22; all statistical significance tests were at  $p < 0.05$  level.

### 3. Results

#### 3.1. Biochemical analysis and SDS-PAGE

Whole CF was found to contain different molecules, such as cholesterol (<2 mg/dl), triglycerides (6 mg/dl), glucose (4 mg/dl), N urea (<3 mg/dl), proteins (3.072 µg/µl), and different ions, including Ca<sup>2+</sup> (30.47 mg/dl), Mg<sup>2+</sup> (9.4 mEq/l), Na<sup>+</sup> (481 mmol/l), K<sup>+</sup> (12 mmol/l), and Cl<sup>2-</sup> (639 mmol/l). In general, in thermostable fractions (both 56 and 72 °C), the amount of cholesterol, triglycerides, glucose, N urea, proteins, and different ions did not change significantly. However, we found that only five elements were detected in the precipitate (PP), glucose, N urea, proteins, Na<sup>+</sup>, and Cl<sup>2-</sup>, but always in a lower proportion than in SN. Only N urea was higher in PP than in SN (1.3 vs < 0.5 mg/dl). Regarding proteins,

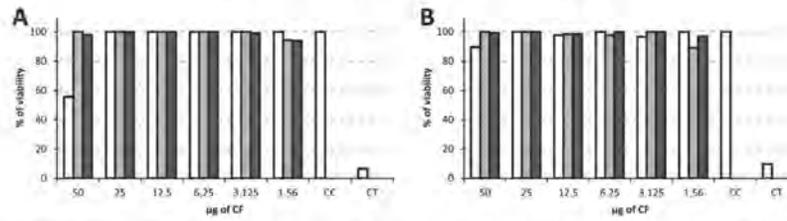


Fig. 2. Sea urchin coelomic fluid (CF) toxicity on MDBK (A) and BHK-21 (B) cells, expressed as percentage of viability, performing a MTT assay. CC, cellular control; TC, toxicity control.

it is important to mention that the amount in PP at 56 and 72 °C was very small, and they were insoluble (0.24 and 0.35 µg/µl, respectively); moreover, detection was performed by the absorbance at 280 nm, as the samples were negative according to the Bradford method. pH in the CF and both SNs (56 and 72) was 7.4.

The 12.5% SDS-PAGE of the proteins in CF (whole, thermostable fractions, and PPs) is shown in Fig. 1. Whole CF contained 0.3072 µg/µl protein; when CF was concentrated, the total protein quantification was 3.072 µg/µl, and this was used for the ensuing assays (Fig. 1; lanes 2 and 3). Differences in intensity and the number of proteins between SN and PP of CF exposed to 56 and 72 °C were observed (lanes 4–7). SN (thermostable fraction) showed four proteins (lanes 4 and 6): one at ~25 kDa, two between 55 and 72 kDa, and the one at ~150 kDa, the latter being clearly present only in SN. In addition, the PP (lanes 5 and 7) showed one protein at ~40 kDa and another at ~45 kDa, both only in PP72 °C.

### 3.2. Cytotoxicity evaluation

CF was more toxic to the MDBK cells than BHK-21 cells. At 50 µg, whole CF resulted in approximately 55% viability in the MDBK cells and 90% in the BHK-21 cells. However, a complete loss of toxicity was observed with the thermostable fractions (SN at 56 and 72 °C), with 100% viability for both cell types. The three samples (whole CF and two thermostable fractions) presented 100% viability with 25 µg and the dilutions (Fig. 2).

### 3.3. Antiviral activity against SHV-1 and PV

For SHV-1, in the virus control, an average of 63 lytic plaques/well was formed (mean of three assays); however, with 33 µg of CF, a 57% inhibition was observed (Fig. 3A). Regarding RV, the effect was observed since 21 µg with 93% inhibition, being equivalent to <0.5 IU/ml, but 31 µg CF was inhibited up to 93% of RV infection (0.8 IU/ml) (Fig. 3B).

### 3.4. Thermostability assay

Because whole CF was toxic to cells, the antiviral activity in the thermostable fractions (SN of 56 or 72 °C) was tested, as these fractions were not toxic. The thermostable fractions of CF showed an inhibitory effect against SHV-1 and RV. The molecules in CF with antiviral activity were stable (Fig. 1, lanes 4 and 6, SN). In Fig. 4A, we show that the antiviral effect on SHV-1 was conserved in the thermostable fractions (SN) at 56 and 72 °C with approximately 72% inhibition; whereas in the PPs at both temperatures the inhibition was lower (30 and 21% at 56 and 72 °C, respectively). The inhibition of SHV-1 obtained with CF, SN56, and SN72 was significant ( $p < 0.001$ ) when compared to PP72. However, standard deviation in PP56 was high, therefore differences were not significant. Neutralization of RV was also observed using the thermostable fractions (SN) at both temperatures (Fig. 4B); in fact, the effect was maintained at the same level as in the whole CF with 97% in the three samples, when the IUs were calculated, a small difference was found: for CF and SN56 0.3 IU/ml, and for SN72 0.4 IU/ml. The inhibition was almost null in PPs (6 and 1% at 56 and 72 °C, respectively or 0 IU/ml for both). For this virus, the differences between CF, SN56, and SN72 were significant ( $p < 0.001$ ) compared with both PPs (56 and 72).

### 3.5. Direct or indirect effect determination

The antiviral effect of CF thermostable fraction (SN72 °C) was direct against SHV-1 and RV (Fig. 5), indicating that CF needs to be present in the solution to have an effect on cell infection. Fig. 5A shows that, in the presence of CF, 74% inhibition was observed for SHV-1, whereas less than 10% inhibition was produced with CF SN or cell SN (supernatant of cells without CF) ( $p < 0.001$ ). A similar effect was found for RV (Fig. 5B), the best inhibition was observed in presence of CF (99%, or 0.7 IU/ml); with CF SN and cell SN, 73 and 55% respectively (0.3 and 0.1 IU/ml), was observed but this was

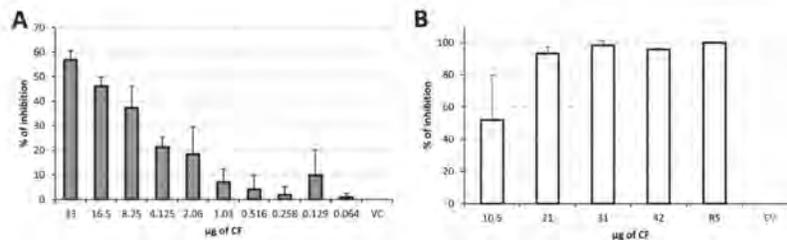


Fig. 3. Sea urchin CF dose–response curves for Suid herpesvirus type 1 (SHV-1) (A) and rabies virus (RV) (B); R5, reference serum (10 IU/ml); VC, virus control.

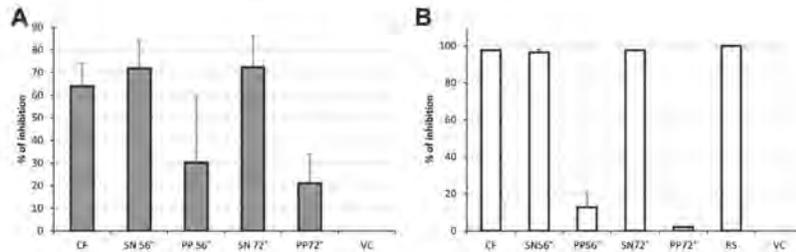


Fig. 4. Antiviral effect of the supernatant (SN) and precipitate (PP) obtained from the coelomic fluid (CF) after heat treatment against SHV-1 (A) and RV (B). RS, reference serum (10 U/ml); VC, virus control.

quite variable and just the difference between cell SN and CF or RS was significant ( $p < 0.05$ ), this produced perhaps by traces of CF in the supernatant.

### 3.6. Action moment

For SHV-1, the highest inhibition (68%) was observed when CF was incubated with the virus prior to addition to the cells (co-infection or neutralization) compared to the virus control or pre- and post-infection treatments (0 and 8%, respectively) ( $p < 0.05$ ) (Fig. 6A). Even in the pre-infection treatment more plaques were formed than in virus control, perhaps the molecules in the CF facilitated the access to the virus by cell membrane destabilization. For RV, the best effect was observed in the co-infection or neutralization treatment, with 68% inhibition (0.6 IU/ml) under these conditions versus 24% or 8% for pre- and post-infection treatments (0 IU/ml), respectively ( $p < 0.05$ ) (Fig. 5B).

## 4. Discussion

Different molecules isolated from invertebrates exhibit antiviral activity, even against viruses that would not normally infect these organisms. In this work, the presence of antiviral activity in the coelomic fluid of the sea urchin *T. depressus* was demonstrated to inhibit the infection of cells by SHV-1 and RV in *in vitro* assays. Despite being a very promising area of research, there is little information regarding the biochemical composition of the coelomic fluid (CF) of this sea urchin. However, the present study shows that some thermostable (56 and 72 °C) components of CF have antiviral effects.

Regarding the biochemical composition of the sea urchin CF, little information has been reported and most of the studies work

with the composition of gonads, perhaps because in the sea urchin this part has economic relevance. Arafa *et al.* (2006) reported the levels of nitrogenous compounds in gonads and coelomic fluid of the sea urchin, *Paracentrotus lividus*, finding 90  $\mu\text{mol/l}$  free amino acids, 1.5  $\mu\text{mol/l}$  trimethylamine, and 1.9  $\mu\text{mol/l}$  ammonia ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ) when first captured [29]; in our case, the test for N urea detected all the nitrogen in the CF (<3 mg/dl) and the sensitivity was lower, so we need to perform further determinations to compare the nitrogenous compounds in the CF between two populations and species. Regarding pH, we reported that CF has 7.4, and this is in agreement with Arafa *et al.* [29], who reported pH values of 7.43–7.78 in the coelomic fluid of *P. lividus* sea urchin.

Molecules, such as secondary metabolites, extracted from animals, plants, and algae also have activity against viruses. Gymnochrome D and isogymnochrome D isolated from the living fossil crinoid *Gymnocrinus richeri* have a potent activity against dengue virus, showing a focus-reduction effect at doses lower than 1  $\mu\text{g/ml}$  (<0.89 nM) [27]. In the case of sea urchin CF, ~30  $\mu\text{g}$  was sufficient to reduce the replication of the virus by more than 50%. However, there are important differences between these two examples. Gymnochromes comprise a family of purified molecules, whereas the CF solution contains additional molecules that could cause interference with regard to a) the antiviral effects or b) the quantification assay results, as 3.072  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  total protein includes molecules that do not have antiviral effects.

Pan and collaborators [3] reported a molecule from blue crab (*C. sapidus*) with an antiviral effect against SV and demonstrated that a 440 kDa fraction was involved in viral adherence to cells. It is possible that this mechanism is similar for CF because the best effect against SHV-1 was present when CF was preincubated with the virus (before adding to the cells) (Fig. 5). The findings of Roch and collaborators [4] support this idea, as the fragments of mussel

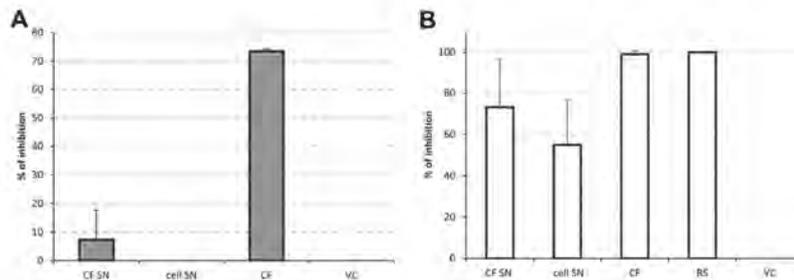


Fig. 5. Antiviral effect of coelomic fluid against SHV-1 (A) and RV (B) is direct. CF, coelomic fluid; SN, supernatant; RS, reference serum (10 U/ml) VC, virus control.

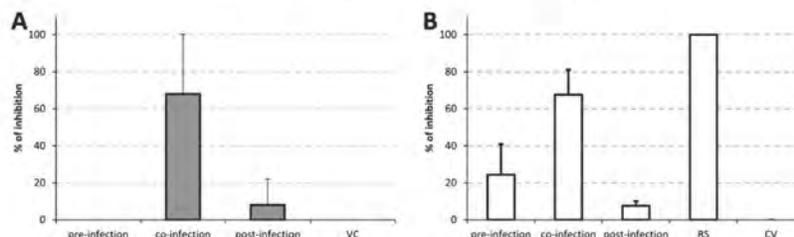


Fig. 6. Action moment of the thermostable fraction of CF. RS, reference serum (10 IU/ml); VC, virus control.

defensin show the best inhibition under the same conditions, and their capacity increases when the positive net charge of the fragments is increased. A positive net charge of AMPs is well documented [28], and this condition is favored because AMPs can thus bind or interact with the cell or viral membranes, blocking their adherence. Another study that supports this idea was previously reported by us: the activity against AcNPV baculovirus of a polypeptide extracted from the exoskeleton of *Pleuroncodes planipes* was studied, and the best inhibition was observed when virus and polypeptide were incubated prior to addition to the cells [10]. As in the present study, we consider that these molecules may act by interfering with the virus-cell junction, either via membrane destabilization or receptor blockage.

The fact that the inactivated CF (SN72 °C) or thermostable fraction maintained 100% MDBK and BHK-21 cell viability is important because it allows additional studies with a wide range of extract concentrations. Indeed, we can compare our results with the acid extract obtained from five mollusks, with three species presenting a high inhibition but two having high cytotoxicity [11].

The isolation and characterization of new antiviral molecules from invertebrates are important areas of research because these molecules could become models for the design of new drugs. We can learn much from these ancient organisms that have been and are in contact with thousands of different viruses.

#### Acknowledgments

This work was part of Mónica Salas-Rojas' PhD thesis, which was supported by CONACYT (México). This work was financed by The Instituto Mexicano del Seguro Social, México (Grant No. FIS/IMSS/PROT/760) and SEP-CONACYT Ciencia Básica (Grant No. 168407). We thank Verónica Vrátný for the revision of the manuscript. We thank the Posgrado en Ciencias Biológicas (UNAM) for the formation given to the student Mónica Salas-Rojas.

#### References

- Balseiro P, Falcó A, Romero A, Dios S, Martínez-López A, Figueras A, et al. *Mytilus galloprovincialis* Myticin C: a chemotactic molecule with antiviral activity and immunoregulatory properties. *PLoS ONE* 2011;6:e23140.
- Nakamura T, Furunaka H, Miyata T, Tokunaga F, Muta T, Iwanagall S. Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the Horseshoe Crab (*Tachyplesus tridentatus*). *J Biol Chem* 1988;263:16709–13.
- Pan J, Kursky A, Xu B, Chopra AK, Coppenhaver DH, Singh IP, et al. Broad antiviral activity in tissues of crustaceans. *Antiviral Res* 2000;48:39–47.
- Roch P, Beschin A, Bernard E. Antiprotozoan and antiviral activities of non-cytotoxic truncated and variant analogues of mussel defensin. *eCAM* 2004;1:167–74.
- Roch P, Yang Y, Toubiana, Aumelas A. NMR structure of mussel mytilin, and antiviral-antibacterial activities of derived synthetic peptides. *Dev Comp Immunol* 2008;32:227–38.

- Dang VT, Speck P, Doroudi M, Smith B, Benkendorf. Variation in the antiviral and antibacterial activity of abalone *Haliotis laevis*, *H. rubra* and their hybrid in South Australia. *Aquaculture* 2011;315:242–9.
- Olicard C, Renault T, Torhy C, Benmansour A, Bourgougnon N. Putative antiviral activity in hemolymph from adult pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Antiviral Res* 2005;66:147–52.
- Lee T-G, Maruyama S. Isolation of HIV-1 protease-inhibiting peptides from thermolysin hydrolysate of oyster proteins. *Biochem Biophys Res Comm* 1998;253:604–8.
- Bachère E, Hervio D, Mialhe E, Grizel H. Evidence of neutralizing activity against T3 coliphage in oyster *Crassostrea gigas* hemolymph. *Dev Comp Immunol* 1990;14:261–8.
- Galvez-Romero G, Salas-Rojas M, Hernández GM, Blanco-Favela F, Aguilar-Setién A. Anti-baculovirus activity in a protein extracted from the exoskeleton of *Pleuroncodes planipes* [Decapoda:Galatheidae]. *Fish Shellfish Immunol* 2011;31:482–4.
- Defer D, Bourgougnon N, Fleury Y. Screening for antibacterial and antiviral activities in three bivalve and two gastropod marine molluscs. *Aquaculture* 2009;293:1–7.
- Donnelly JJ, Vogel SN, Prendergast RA. Down-regulation of Ia expression on macrophages by sea star factor. *Cell Immunol* 1985;90:408–15.
- Kerlin RL, Cebra JJ, Weinstein PD, Prendergast RA. Sea star factor blocks development of T-dependent antibody secreting clones by preventing lymphokine secretion. *Cell Immunol* 1994;156:62–76.
- Al-Sharif WZ, Oriol JS, Lambris JD, Smith C. Sea urchin coelomocytes specifically express a homologue of the complement component C3. *J Immunol* 1998;160:2983–97.
- Clow IA, Raftos DA, Gross PS, Smith C. The sea urchin complement homologue, SpC3, functions as an opsonin. *J Exp Biol* 2004;207:2147–55.
- Hibino T, Loza-Coll M, Messier C, Majeske AJ, Cohen AH, Terwilliger DP, et al. The immune repertoire encoded in the purple sea urchin genome. *Dev Biol* 2006;300:349–65.
- Ramírez-Gómez F, Aponso-Rivera F, Méndez-Castener L, García-Arriarán JE. Changes in holothurian coelomocyte populations following immune stimulation with different molecular patterns. *Fish Shellfish Immunol* 2010;29:175–85.
- Dheilly NM, Haynes PA, Bove U, Nair SV, Raftos DA. Comparative proteomic analysis of the sea urchin (*Heliocidaris erythrogramma*) antibacterial response revealed the involvement of apextrin and calreticulin. *J Invert Pathol* 2011;106:223–9.
- Mokhlesi A, Saeidnia S, Gohari AR, Shahverdi AR, Nasrolahi A, Farahani F, et al. Biological activities of the sea cucumber *Holothuria leucospilata*. *Asian J Animal Vet Advances* 2012;7:243–9.
- Sea Urchin Genome Sequencing Consortium. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science* 2006;314:941–52.
- Kumar JR, Zi-rong Xu. Biomedical compounds from marine organisms. *Mar Drugs* 2004;2:123–46.
- Mena JA, Ramírez TO, Palomares LA. Titration of non-occluded baculovirus using a cell viability assay. *Biotechniques* 2003;34:260–4.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- Mahy BWJ. *Virology a practical approach*. IRL Press; 1991. p. 264.
- Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H. *Laboratory techniques in rabies*. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996.
- Laillé M, Gerald F, Debitus C. In vitro antiviral activity on dengue virus of marine natural products. *CMLS Cell Mol Life Sci* 1998;54:167–70.
- Bulet P, Stöcklin R, Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* 2004;198:169–84.
- Arafá S, Sadok S, El Abed A. Variation in nitrogenous compounds and gonad index in fed and starved sea urchins (*Paracentrotus lividus*) during live storage. *Aquaculture* 2006;257:525–33.