

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**MECANISMO DE ACCIÓN ANTIVIRAL DE POLISACÁRIDOS SULFATADOS
DE ALGAS SOBRE EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE
Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES RESISTENTES**

Por:

REGINA ELIZONDO GONZÁLEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA

ABRIL, 2014

**MECANISMO DE ACCIÓN ANTIVIRAL DE POLISACÁRIDOS SULFATADOS
DE ALGAS SOBRE EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE Y
CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES RESISTENTES**

Comité de Tesis

Dra. Laura Trejo Ávila
Director de la tesis

Dra. Lucia Elizabeth Cruz Suárez
Secretario

Dra. Diana Resendez Pérez
Vocal

Dr. Denis Ricque Marie
Vocal

Dr. Carlos Hernández Luna
Vocal

AGRADECIMIENTOS

*A la **Dra. Laura Trejo** por ser mi mentora desde hace muchos años, por su tiempo brindado, por su paciencia, por su confianza y apoyo para mi desarrollo profesional*

*A la **Dra. Elizabeth Cruz** y al **Dr. Denis Ricque** por su ayuda, asesoría y consejos durante la realización de la tesis.*

*Al **Dr. Carlos Hernández** y la **Dra Diana Resendez** por apoyarme durante todo el proyecto de tesis y ser parte de mi comisión de tesis*

*A **Edgar Fernandez** por su amistad y por todo el apoyo brindado en el laboratorio durante gran parte de la tesis*

*A mis compañeros y amigos del laboratorio **MC. Karla Morán**, **MC. Santiago Saavedra**, **MC. Karina Chávez**, **Q.B.P. Karen Ávila**, **Q.B.P Talyha**, **MC. Jeannie Hernández**, **Juan**, gracias por su apoyo y amistad.*

*Al Proyecto de **CONACYT (PAICYT CN-1567-07)** por el apoyo económico otorgado para el desarrollo del proyecto*

*Al **CONACYT** por la beca otorgada durante todo el periodo del desarrollo de este proyecto de tesis*

DEDICATORIA

A DIOS por permitirme terminar una etapa más en mi vida

A mi esposo Alberto, por apoyarme incondicionalmente y estar en todo momento a mi lado, eres el motor de mi vida.

A mi hijo Emilio quien me motiva a ser una mejor persona.

A mi madre Regina González por encaminarme al estudio y motivarme a superarme cada día más.

A mi hermana Paola Elizondo quien siempre ha sido un apoyo importante en mi desarrollo personal y profesional.

ÍNDICE

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	3
DEDICATORIA	4
ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	11
RESUMEN.....	14
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUCCIÓN	16
2. ANTECEDENTES.....	18
2.1 Agentes Antivirales.....	18
2.1.1 Sustancias Polianiónicas Provenientes de Algas con Efecto Antiviral.....	20
2.1.2 Mecanismo de Acción Antiviral de los Polisacáridos Sulfatados.....	25
2.1.3 Aplicaciones Clínicas de los Polisacáridos Sulfatados	29
2.1.4 Ventajas del Uso de Polisacáridos	30
2.1.5 Recursos Algales de México.....	31
2.2 Virus de la Enfermedad de Newcastle	32
2.2.1 Clasificación y Características Generales del NDV.....	33
2.2.2 Replicación del Virus de Newcastle	35
2.2.3 Características Histopatológicas Producidas por NDV.....	37
2.3 Agentes Antivirales en la Industria Avícola	38
2.3.1 Actividad Inhibitoria de Polisacáridos Sulfatados contra NDV	39
2.4 Generación de Mutantes Resistentes por Uso de Antivirales	40
3. JUSTIFICACIÓN	43
4. HIPÓTESIS.....	44
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	45

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	46
6. MATERIAL Y METODOS.....	47
6.1 Diseño Experimental.....	47
6.2 Preparación de los Extractos.....	48
6.3 Evaluación del Efecto Citotóxico de los Compuestos.....	48
6.3.1 Cultivo de Células VERO (Riñón de Mono Verde Africano).....	48
6.3.2 Obtención de Cultivo Primario de Fibroblastos de Embrión de Pollo (CPFEP)	49
6.3.3 Determinación del Efecto de los Extractos Sobre la Viabilidad Celular en CSFEP y Células VERO por la Técnica Colorimétrica MTT.....	50
6.4 Efecto Antiviral.....	50
6.4.1 Propagación del Virus NDV en Embrión de Pollo.....	50
6.4.2 Titulación del NDV.....	51
6.4.3 Prueba de Inhibición de Sincicios.....	52
6.4.4 Prueba de Inhibición Viral por Medio de UFP.....	52
6.4.5 Prueba de Inhibición del Efecto Citopático de los Agentes Antivirales a Diferentes Tiempos de Infección.....	53
6.4.6 Pruebas de Inhibición de la Fusión Celular.....	53
6.4.7 Pruebas de Inhibición de la Penetración Viral.....	54
6.4.8 Extracción de Proteínas.....	54
6.4.9 Western blot.....	55
6.4.10 Inmunofluorescencia.....	58
6.4.11 Análisis de la Inhibición de la Replicación en Embriones de Pollo.....	58
6.4.12 Inducción de Mutantes de NDV al Polisacárido Sulfatado o Ribavirina.....	61
6.4.13 Aislamiento Independiente de Virus Mutantes Resistentes.....	62
6.4.14 Amplificación de las Secuencias HN y F del NDV.....	63
6.4.15 Secuenciación de las Mutantes de NDV Resistentes a los Polisacáridos Sulfatados.....	65
6.4.16 Análisis Estadístico.....	66
7. RESULTADOS.....	67
7.1 Efecto Citotóxico del Fucoidán de <i>Cladosiphon okamuranus</i> y los Extractos de <i>Macrocystis pirifera</i> y <i>Ulva clathrata</i> “in vitro”.....	67
7.1.1 Efecto Citotóxico del Fucoidán de <i>C. okamuranus</i> y los Extractos de <i>Macrocystis pirifera</i> y <i>Ulva clathrata</i> en Cultivo Secundario de Fibroblastos de Embrión de Pollo.....	67

7.1.2 Efecto Citotóxico del Fucoídán de <i>C. okamuranus</i> y los Extractos, en la Línea Celular VERO	69
7.2 Efecto Antiviral de los Polisacáridos Sulfatados sobre el Virus de la Enfermedad de Newcastle	71
7.2.1 Obtención del Título del Virus Newcastle por Dosis Infecciosa en Cultivo de Tejidos al 50% (DICT ₅₀).....	71
7.2.2 Obtención del Título del Virus Newcastle por Unidades Formadoras de Placas (UFP).....	71
7.2.3 Evaluación del Efecto de los Polisacáridos Sulfatados sobre la Formación de Sincicios Producidos por NDV	71
7.2.4 Evaluación del Efecto de los Polisacáridos Sulfatados sobre la Infección de NDV por UFP	73
7.2.5 Inhibición de Sincicios y UFP a Producidos por NDV a Diferentes Horas de la Infección.....	75
7.2.6 Efecto del Fucoídán en la Primera Hora de la Infección (Adsorción y Entrada)	77
7.2.6.2 Efecto del Fucoídán en la Síntesis de la Proteína HN de NDV	79
7.2.6.3 Análisis de Inhibición de NDV, en Células Infeccionadas y Tratadas con Fucoídán en Diferentes Tiempos de la Etapa de Entrada Viral por Inmunofluorescencia.....	80
7.2.7 Capacidad de Fucoídán para Bloquear la Fusión Célula-célula Inducida por NDV	82
7.2.8 Efecto del Fucoídán sobre la Penetración Viral en la Célula Hospedera.....	84
7.3 Efecto del Fucoídán en la Replicación de NDV <i>in ovo</i>	85
7.4 Obtención de Mutantes Virales Resistentes a los compuestos.....	87
7.4.1 Obtención de Mutantes Virales Resistentes a la Ribavirina	87
7.4.2 Susceptibilidad de las Mutantes Virales Resistentes a la Ribavirina al Fucoídán de <i>C. okamuranus</i>	89
7.4.3 Obtención de Mutantes Virales Resistentes al Fucoídán	90
7.4.3.1 Secuenciación de las Mutantes Virales Resistentes al Fucoídán	91
7.4.3.2 Análisis de Aminoácidos de las Mutantes Virales Resistentes al Fucoídán	93
8. DISCUSIONES.....	97
9. CONCLUSIONES	107
10. PERSPECTIVAS	109
11. BIBLIOGRAFÍA	110
APÉNDICE	123
RESUMEN BIOGRÁFICO	126

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I Miembros de la familia Paramyxoviridae.....	33
Tabla II Oligonucleótidos utilizados para el PCR de NDV.....	63
Tabla III Condiciones de PCR Semicuantitativo para NDV.....	63
Tabla IV Inducción de mutantes virales resistentes al fucoidán y a la ribavirina.....	64
Tabla V Oligonucleótidos utilizados en la amplificación de los fragmentos F y HN de NDV	67
Tabla VI Cambios nucleotídicos de las clonas mutantes virales resistentes al fucoidán.....	95
Tabla VII Cambios en la secuencia de aminoácidos de las clonas mutantes virales resistentes al fucoidán.....	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del fucoidán de <i>C. okamuranus</i>	22
Figura 2. Imagen del alga verde <i>Ulva clathrata</i>	24
Figura 3. Representación esquemática del genoma del NDV.....	34
Figura 4. Esquema de los componentes típicos de un Paramixovirus.	35
Figura 5. Ciclo replicativo general de los Paramyxovirus.	37
Figura 6. Estrategia general del desarrollo del trabajo de tesis.....	47
Figura 7. Representación gráfica de la transferencia de las proteínas en dirección de polo negativo a positivo.	57
Figura 8. Representación gráfica de la posición de los primers para amplificar las regiones codificantes para las proteínas HN y F de NDV.	64
Figura 9. Efecto del fucoidán de <i>C. okamuranus</i> y los extractos de <i>U. clathrata</i> y <i>M. pyrifera</i> sobre la viabilidad del CSFEP.....	69
Figura 10. Efecto del fucoidán de <i>C. okamuranus</i> , los extractos de <i>U. clathrata</i> y <i>M. pyrifera</i> y el antiviral de uso comercial Ribavirina sobre la viabilidad en la línea celular VERO.....	70
Figura 11. Efecto del fucoidán de <i>C. okamuranus</i> , del extracto de <i>U. clathrata</i> , del extracto de <i>M. pyrifera</i> y de la Ribavirina sobre la formación de sincicios por NDV.....	73
Figura 12. Efecto del fucoidán de <i>C. okamuranus</i> y la ribavirina sobre la formación de UFP por NDV..	74
Figura 13. Efecto del fucoidán de <i>C. okamuranus</i> a diferentes horas de la infección sobre la formación relativa de sincicios.....	76
Figura 14. Efecto del fucoidán de <i>C. okamuranus</i> a diferentes tiempos de la infección sobre la formación relativa de UFP.....	77
Figura 15. Inhibición de sincicios producidos por NDV, por efecto del fucoidán de <i>C. okamuranus</i> en los primeros pasos de la infección.	78

Figura 16. Efecto del fucoidán de <i>C. okamuranus</i> en la primera etapa de la infección medido por la formación relativa de UFP.....	79
Figura 17. Niveles de la proteína HN de NDV en las células Vero infectadas con el NDV y tratadas con fucoidán.....	80
Figura 18. Efecto del fucoidán contra NDV en la primera etapa del ciclo viral.....	81
Figura 19. Inhibición de la fusión celular mediada por una cepa avirulenta de NDV (La Sota)..	83
Figura 20. Efecto del fucoidán de <i>C. okamuranus</i> en la penetración viral..	85
Figura 21. Niveles de RNA del virus NDV en embriones de pollo infectados con NDV y tratados con fucoidán.....	87
Figura 22. Comparativo de la actividad antiviral de la ribavirina con el stock viral wild-type y mutantes resistentes.....	88
Figura 23. Concentración de Ribavirina utilizada en la selección de resistencia por parte de NDV.....	89
Figura 24. Comparativo de la susceptibilidad al fucoidán de <i>C. okamuranus</i> del stock viral wild-type y mutante viral resistente a la ribavirina.....	90
Figura 25. Comparativo de la susceptibilidad al fucoidán de <i>C. okamuranus</i> del stock viral wild-type y el stock sometido a dosis crecientes del compuesto.....	91
Figura 26. Concentración del fucoidán utilizado en la selección de resistencia por parte de NDV.....	92
Figura 27. Representación gráfica de los cambios de residuos de aminoácidos en la proteína de fusión.....	96
Figura 28. Representación gráfica de los cambios de residuos de aminoácidos en la proteína HN.....	97

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

α	Alpha
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
ACV	Acyclovir
AZT	Azidotimidina
BHK-21	Clona 21 fibroblastos de riñón de hamsters
CC	Concentración Citotóxica
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementario
CDV	Virus de Distemper Canino
CE	Concentración Efectiva
CEF	Fibroblastos de Embrión de Pollo
cm^2	Centímetro cuadrado
CMV	Citomegalovirus
CO_2	Bióxido de Carbono
CPFEP	Cultivo Primario de Fibroblasto de Embrión de Pollo
CSFEP	Cultivo Secundario de Fibroblasto de Embrión de Pollo
DEPC	Dietilpolicarbonato
DICT ₅₀	Dosis Infecciosa en Cultivo de Tejido al 50%
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's médium
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato

EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EUA	Estados Unidos de América
F	Proteína de Fusión
FITC	Fluorescein isothiocyanate
g	Gramo
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GCV	Ganciclovir
H	Horas
HBV	Virus de la Hepatitis B
HCV	Virus de la Hepatitis C
HIV-1	Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo I
HN	Proteína Hemaglutinina-Neuroaminidasa
HRV	Rinovirus Humano
HSV	Virus Herpes Simple
IgG	Inmunoglobulina G
IS	Índice de selectividad
kb	Kilobases
Kg	Kilogramo
M	Proteína de Matriz
mg	Miligramo
Mg	Magnesio
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 bromuro difeniltetrazolium
NDV	Virus de la Enfermedad de Newcastle
ng	Nanogramo
Nm	Nanómetros
P	Fosfoproteína
Pb	Pares de bases
PBS	Buffer de Fosfatos

PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de Hidrógeno
PLS	Polisacáridos sulfatados
pmol	Picomol
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA (+)	Ácido Ribonucleico de polaridad positiva
RNAm	Ácido Ribonucleico mensajero
RNP	Ribonucleoproteína del core
rpm	Revoluciones por minuto
RSV	Virus Sincitial Respiratorio
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero Fetal Bovino
SR	Receptor Scraver
TA	Temperatura Ambiente
TBS	Tris-buffer salino
UFP	Unidades Formadoras de Placa
VZV	Virus de la Varicela Zoster
WSS	Virus de la Mancha Blanca

Nota: Se utilizaron en algunos casos las abreviaciones en inglés por ser las más utilizadas internacionalmente.

RESUMEN

El virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) es responsable de una de las enfermedades infecciosas de las aves de corral más importantes debido a su alta morbilidad y mortalidad, generando cuantiosas pérdidas económicas a nivel mundial. Su incidencia ha disminuido gracias a los programas de vacunación; sin embargo, continúan registrándose serios brotes de la enfermedad. Es por ello que surge la necesidad de desarrollar nuevas alternativas para la prevención y/o tratamiento de enfermedades virales que afectan a la industria avícola, los cuales deben ser prácticos, no tóxicos y altamente efectivos. Los polisacáridos sulfatados (PLS) extraídos de algas han demostrado tener diversas actividades biológicas, entre las cuales destaca el efecto antiviral observado en diversos virus envueltos, entre ellos el NDV. En este trabajo determinamos el mecanismo de acción antiviral del fucoidán de *C. okamuranus* sobre NDV. Para determinar el mecanismo de acción antiviral ejercido por el fucoidán de *C. okamuranus* durante la entrada y proceso de replicación de NDV se realizaron ensayos de inhibición de sincicios y UFP y se evaluó la síntesis de la proteína HN por inmunoelectrotransferencia e inmunofluorescencia demostrando una inhibición en las primeras etapas del ciclo viral (0-60 minutos post-infección) a concentraciones no tóxicas. Los ensayos de inhibición de fusión mostraron un efecto directo sobre la proteína “F” inhibiendo eventos de fusión virus-célula y célula-célula. Por otro lado se seleccionaron mutantes de NDV resistentes al fucoidán y se clonaron y secuenciaron las regiones HN y F, a fin de determinar los puntos en donde se ejerce la presión selectiva, se encontraron 9 sustituciones de aminoácidos en la proteína F ubicados entre los aminoácidos 341 al 359 que corresponde a un dominio de la proteína el cual es invariable en las estructuras pre y post fusión y 5 sustituciones de aminoácidos en la proteína HN ubicados entre los aminoácidos 93 a 230; en donde se encuentra la región de interacción específica con F, dichos cambios podrían estar involucrados en la resistencia de NDV al fucoidán de *C. okamuranus* permitiendo su entrada a la célula. Se analizó la susceptibilidad de NDV frente al antiviral comercial ribavirina y el efecto del fucoidán sobre mutantes virales resistentes a la ribavirina encontrando que estas fueron tan susceptibles al tratamiento con fucoidán como la cepa wild-type. Nuestro estudio provee un mejor entendimiento sobre el mecanismo de acción de polisacáridos sulfatados de algas sobre virus envueltos y específicamente nos permite concluir que el fucoidán de *Cladosiphon okamuranus* representa una alternativa prometedora como terapia antiviral contra NDV.

ABSTRACT

Newcastle Disease Virus (NDV) is one of the most serious infectious diseases of poultry birds because of its high morbidity and mortality caused economic losses. Its incidence has decreased due to vaccination programs; however, continue to be recorded serious outbreaks. For this reason comes the need to develop new alternatives for the prevention and/or treatment of viral diseases affecting the poultry industry, which should be practical, non-toxic and highly effective. Sulfated polysaccharides (SP) extracted from algae have shown diverse biological activities, as the antiviral effect seen in various enveloped virus, including NDV. In this work we determined the mechanism of antiviral action of fucoidan from *C. okamuranus* against NDV, during its entry and replication process; syncytium and PFU inhibition assays were performed, and synthesis of the HN protein was assessed by immunoblotting and immunofluorescence to demonstrate an inhibition in early stages of the viral cycle (0-60 min post-infection) at non-toxic concentrations. The fusion inhibition assay showed a direct effect on the protein "F" inhibiting fusion virus-cell and cell-cell events. Furthermore mutants fucoidan resistant NDV were selected, cloned and sequenced the HN and F regions to determine the points where it exerts selective pressure, nine amino acid substitutions were found in the F protein located between amino acid 341 to 359 corresponding to a protein domain which is invariable in the pre and post fusion structures and five amino acid substitutions in the HN protein located between amino acids 93-230, wherein the specific interaction with F protein is located, that changes could be involved in NDV resistance to fucoidan from *C. okamuranus* allowing its entry into the cell. NDV susceptibility was tested against commercial antiviral ribavirin and fucoidan effect on ribavirin resistant viral mutants was analyzed and we found that they were susceptible to fucoidan treatment as the wild-type strain. Our study provides a better understanding of the mechanism of action of sulfated polysaccharides on enveloped viruses and specifically we conclude that fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* represents a promising alternative antiviral therapy for NDV.

1. INTRODUCCIÓN

La obtención de fármacos antivirales siempre ha sido objeto de estudio ya que los virus dependen obligatoriamente para vivir y multiplicarse del metabolismo de la célula que infectan, por lo tanto, los fármacos que bloquean la replicación vírica alteran también el funcionamiento de las células normales, y los límites entre las dosis terapéuticas y las tóxicas son muy estrechos. Por otra parte muchos virus se hacen resistentes a dichas dosis; por esta razón en la actualidad se buscan nuevos agentes que sean específicos para las células infectadas sin alterar las células normales (Lodish *et al.*, 2002).

Desde hace más de 30 años se han reportado los efectos inhibitorios de las sustancias polianiónicas contra HSV y otros virus pero no se le había dado importancia ya que se pensaba que su función no era específica. Hasta los 80's se descubrió que los polisacáridos sulfatados son potentes antivirales, entre estas sustancias se encuentran la heparina y el dextran sulfato los cuales mostraron una alta inhibición contra el HIV-1 *in vitro*. Los polisacáridos sulfatados (PLS) que derivan de las algas marinas han demostrado tener diversas actividades biológicas, entre las cuales destaca un efecto antiviral observado contra diversos virus envueltos entre los cuales se incluyen miembros de las familias de los Retrovirus, Herpesvirus, Flavivirus, Hepadnavirus y Orthomyxovirus (Damonte *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Lahaye and Robic, 2007).

NDV perteneciente a la familia Paramixoviridae, causa una enfermedad altamente contagiosa en aves, siendo responsable de severas pérdidas económicas en la industria avícola. La única forma de controlar esta enfermedad es destruyendo todas las parvadas infectadas e imponiendo una cuarentena estricta y programas de vacunación, sin embargo aún con estas medidas se presentan brotes serios. NDV, al tener características

comunes con otros miembros de su familia así como compartir mecanismos de entrada con otras familias virales, es utilizado como modelo para el estudio de otros virus, incluyendo el virus de la influenza (Fenner *et al.*, 1992; Alexander, 2000; Dortmans *et al.*, 2012).

En este trabajo se evaluó el mecanismo de acción antiviral del polisacárido sulfatado fucoidán de *C. okamuranus* sobre NDV, la tendencia de inducción de mutantes resistentes así como la susceptibilidad de las mutantes virales resistentes a la ribavirina.

El uso del fucoidán de *C. okamuranus* como preventivo y /o como terapia combinada con otras sustancias de uso clínico en la industria avícola podría prevenir y controlar NDV y otros virus relacionados.

2. ANTECEDENTES

2.1 Agentes Antivirales

Durante mucho tiempo se creía que era imposible bloquear la replicación viral sin afectar a la célula, ya que los virus durante su ciclo replicativo utilizan las rutas metabólicas normales de la célula (De Clercq, 1982).

Sin embargo este concepto no fue sostenido por mucho tiempo, ya que al final de los años 70's, se descubrió que la mayoría de los virus codifican enzimas que no se encuentran presentes en las células no infectadas. Este descubrimiento representó el mayor avance de la terapia antiviral, al dirigir esfuerzos para encontrar inhibidores específicos de estas enzimas.

Al final de los años 70's y principios de los 80's se desarrolló y comercializó el acyclovir, el primer agente lo suficientemente no tóxico con la capacidad de tratar un amplio rango de infecciones causadas por herpesvirus, en forma ambulatoria y también en aquellos pacientes con infecciones severas. En los 80's y 90's se observó una explosión en el desarrollo de agentes antivirales, esto en parte por la presencia del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (Bonnie, 1992).

En la actualidad, el repertorio de drogas antivirales comprende solamente 40 compuestos que están oficialmente aprobados para uso clínico, de las cuales la mitad de ellos se utilizan para el tratamiento de las infecciones por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV). Los otros antivirales son principalmente utilizados para el tratamiento contra el Virus de la Hepatitis B (HBV), Virus del Herpes Simple

(HSV), Virus de la Varicela Zoster (VZV), Citomegalovirus (CMV), Virus de la Influenza, Virus Sincitial Respiratorio (RSV) y el Virus de la Hepatitis C (HCV) (De Clercq, 2004).

La efectiva vacunación ha controlado o erradicado algunos de los virus de importancia médica, tal es el caso del Virus de la Polio, Sarampión, Paperas, Rubeola y Viruela. Sin embargo, para otras enfermedades de origen viral, particularmente el HIV y el HCV, no se cuenta actualmente con una vacuna para su control y en otros casos como los Virus de la Hepatitis B (HBV) y Virus Influenza tipo A y B, el desarrollo y uso de vacunas no ha eliminado la necesidad de agentes terapéuticos efectivos (De Clercq, 2004). Por otra parte, no todas las drogas antivirales son siempre efectivas o bien toleradas. Los fármacos que bloquean la replicación viral alteran también el funcionamiento de las células normales y los límites entre las dosis terapéuticas y las dosis tóxicas son muy estrechas. La capacidad viral de mutar rápidamente y generar cepas resistentes a los fármacos da como resultado un constante interés de reemplazar las drogas antivirales que incluyan diferentes modos de acción. Para muchos virus, especialmente el HCV y HIV, la rápida adaptación y la resistencia a los fármacos hacen que muchos tratamientos sean inefectivos después del uso repetido (McCarthy, 2007). A pesar de que la adaptación viral puede afectar el mercado de las drogas antivirales, también crea un potencial para que nuevas drogas entren a este (McCarthy, 2007; Ghosh *et al.*, 2009).

En la medicina veterinaria, las infecciones producidas por virus representan una amenaza constante. Un ejemplo es el “moquillo” producido por el Virus del Distemper Canino (CDV), el cual se han documentado brotes en muchos países como Dinamarca, EUA, Finlandia, Japón y Alemania aún en perros vacunados. Las opciones terapéuticas se limitan al tratamiento de los síntomas y a la eutanasia una vez que se observan los signos clínicos neurológicos, ya que no se cuenta con un antiviral específico (Jozwik and Frymus, 2005; Scagliarini *et al.*, 2006). En el caso particular de la industria avícola, las infecciones virales causan serias bajas en la productividad, con las consecuentes pérdidas económicas. La aplicación de agentes antivirales no es realizada debido a la

alta toxicidad que la mayoría de éstos presenta. Aunado a lo anterior los costos son tan altos que se prefiere la eliminación de las parvadas a su tratamiento (Alexander, 2000).

Por lo descrito anteriormente surge la necesidad de desarrollar nuevas alternativas de prevención y/o tratamiento de enfermedades virales de importancia clínica y veterinaria, que sean efectivas, no tóxicas y económicas.

Una alternativa promisoriosa es la búsqueda de productos antivirales derivados de fuentes naturales; como flora terrestre, hongos, bacterias, flora y fauna marina. El ambiente marino representa la mitad de la biodiversidad global, en el cual se estima que existen entre 3 y 500 millones de diferentes especies, ofreciendo una infinidad de recursos (Yasuhara-Bell and Lu, 2010).

2.1.1 Sustancias Polianiónicas Provenientes de Algas con Efecto Antiviral

Desde hace mucho tiempo se conoce que los organismos marinos contienen sustancias con potentes actividades biológicas. Se han realizado investigaciones científicas al respecto en los últimos 50 años en numerosas formas de vida marina, como bacterias, algas, esponjas, hongos, corales, etc. Muchos productos farmacológicos y terapéuticos han sido obtenidos de organismos marinos, de los cuales algunos ya se encuentran disponibles en el mercado (Yasuhara-Bell and Lu, 2010).

Algunas investigaciones han demostrado que las algas producen una gran variedad de metabolitos biológicamente activos, que presentan estructuras moleculares únicas, capaces de inhibir ciertos microorganismos como bacterias, virus y hongos, por lo que en los últimos años se ha incrementado la investigación bioquímica y su uso médico (Carlucci *et al.*, 2002; Ghosh *et al.*, 2009).

Ejemplo de estos metabolitos son los polisacáridos sulfatados de algas, los cuales en años recientes han demostrado tener actividad *in vitro* e *in vivo* contra una gran variedad

de virus envueltos entre los cuales se incluyen los Retrovirus (VIH-1 y VIH-2), Herpesvirus (HSV tipo 1 y 2, Citomegalovirus), Flavivirus (Virus del Dengue tipo 2), Poxvirus (Virus de la Vaccinia), Hepadnavirus (HBV), Orthomyxovirus (Virus de la Influenza A), Paramyxovirus (RSV y Virus de la Parainfluenza), Rhabdovirus (Virus de la Estomatitis Vesicular), Arenavirus (Virus Junin, Virus Tacaribe) y Togavirus (Virus Sindbis) (Damonte *et al.*, 2004; Yasuhara-Bell and Lu, 2010).

Adicionalmente, los polisacáridos sulfatados han sido objeto de investigación en otras áreas de estudio dentro del campo de interés clínico, y se les han atribuido actividades biológicas, como: antiangiogénica (Hahnenberger *et al.*, 1993), antihemaglutinante (Parish *et al.*, 1984), antiadhesiva celular (Glabe *et al.*, 1983), contraceptiva (Jones, 1991), antibacterial (Utt and Wadstrom, 1997), anticoagulante (Pomin *et al.*, 2005), antialérgica (Willenborg and Parish, 1988), antiparasítica (Andrews *et al.*, 2005), estimulante de la proliferación de cultivo primario de células epiteliales (Flint *et al.*, 1994), inmunoestimulante (Lins *et al.*, 2009), antiinflamatoria (Willenborg and Parish, 1998), antitrombótica (Vicente *et al.*, 2004), antitumoral (Yip *et al.*, 2006), antimetastásica (Itoh *et al.*, 1995) y antiproliferativa (Belting *et al.*, 1996).

En los últimos años, el estudio de distintas algas rojas, pardas, y verdes ha permitido el aislamiento y evaluación de una gran diversidad de polisacáridos sulfatados de variada estructura química como antivirales contra diferentes virus envueltos (Damonte *et al.*, 2004). Estos polisacáridos sulfatados incluyen a los homopolisacáridos sulfatados, heteropolisacáridos sulfatados, sulfoglicolípidos, carragenanos y fucoidanes.

Una de las ventajas de utilizar a las algas marinas como fuente de polisacáridos sulfatados es su alto contenido en la matriz extracelular, y por lo tanto pueden ser preparados y obtenidos a bajo costo.

Los **fucoidanes**, son polisacáridos sulfatados lineales o con ramificaciones muy cortas; con diferentes pesos moleculares y se clasifican dependiendo de la cantidad de L-Fucosa que se encuentre presente en la molécula. Los homofucanos presentan más del 95% de L-fucosa y los heterofucanos además de L-fucosa pueden contener D-xilosa, D-galactosa y ácido D-glucurónico (Duarte *et al.*, 2001).

Los fucoidanes han sido reconocidos como los polisacáridos con la mayor actividad biológica (Duarte *et al.*, 2001; Damonte *et al.*, 2004a). La actividad biológica de los fucoidanes es evidentemente determinada por su estructura y composición, que varían de acuerdo a las especies de algas, proceso de extracción, y a la temporada de cosecha y condiciones climáticas (Bertheau and Mulloy, 2003; Pujol *et al.*, 2006, 2012).

Cladosiphon okamuranus es un alga parda que se cultiva comercialmente en Okinawa Japón. El fucoidán de *C. okamuranus* es preparado a nivel industrial y utilizado como aditivo en comida, bebidas y cosméticos. Su estructura química fue descrita por Nagaoka *et al* 1999, la cual posee un residuo α 1-3 L-fucosil que es sustituido con ácido D-glucorónico en el carbono 2 y grupos sulfato en el carbono 4 de los residuos L-fucosil. La estructura consta de un grupo sulfato por cada dos moléculas de fucosa y un residuo de glucorónico por cada seis moléculas de fucosa (figura 1). El polisacárido contiene además xilosa como constituyente minoritario (Nagaoka *et al.*, 1999).

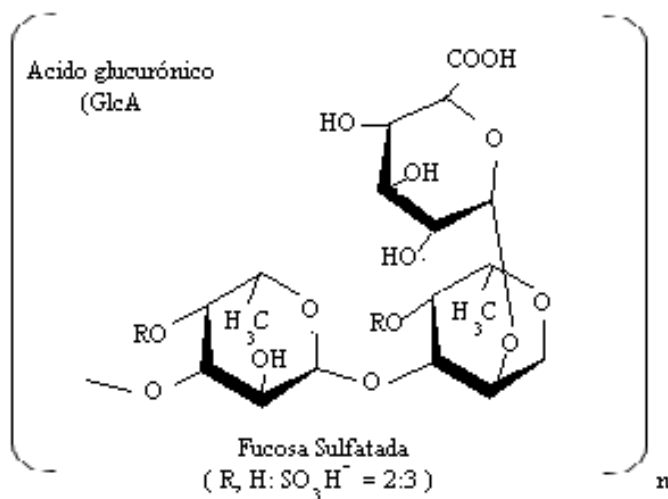


Figura 1. Estructura del fucoidán de *C. okamuranus*

El fucoidán de *Cladosiphon okamuranus* ha sido probado contra virus envueltos de DNA y de RNA, tales como Virus del Dengue tipo 2, CDV, WSV y NDV demostrando potente actividad inhibitoria, no importando su tipo de ácido nucleico (Ponce *et al.*, 2003; Cruz-Suarez, 2007; Hidari *et al.*, 2008; Trejo-Ávila *et al.*, 2008).

Uno de los efectos no deseados de los polisacáridos sulfatados es la actividad anticoagulante. Este efecto adverso puede ser evitado al seleccionar compuestos como el fucoidán de *C. okamuranus*; el cual prácticamente no tiene actividad anticoagulante (Jassim and Naji, 2003; Cumashi *et al.*, 2007; Yashuhara-Bell and Lu, 2010). Cumashi *et al* sugirieron que la alta presencia de ácido glucurónico podría ser responsable de la falta de actividad anticoagulante por parte del fucoidán de *C. okamuranus*, ya que los compuestos menos activos se caracterizan por un bajo grado de sulfatación y una alta presencia de sustituyentes 2-OAD-glucuronil a lo largo de la cadena principal del polisacárido lineal (características del fucoidán de *C. okamuranus*) (Jassim and Naji, 2003; Cumashi *et al.*, 2007; Yashuhara-Bell and Lu, 2010).

Los **ulvanes** extraídos de algas verdes son un grupo de heteropolisacáridos sulfatados cuya actividad biológica depende de diversos parámetros estructurales como el grado de sulfatación, peso molecular, posición de sulfatación, el tipo de azúcar y las ramificaciones (Lahaye and Robic, 2007). Sus principales constituyentes son el sulfato, el ácido glucurónico, xilosa y ramnosa. Diferentes estudios demuestran que sus oligosacáridos poseen diferentes propiedades biológicas valiosas para la agricultura, la alimentación y las aplicaciones farmacéuticas dentro de las que destacan la antitumoral, anticoagulante, así como actividad de modulación inmunitaria y antiviral (figura 2) (Lahaye and Robic, 2007).



Figura 2. Imagen del alga verde *Ulva clathrata*.

Uno de los parámetros más importantes en la actividad antiviral es el grado de sulfatación de los polisacáridos (número de grupos sulfato por residuo de monosacárido). No obstante la posición específica del grupo sulfato representa un papel importante en la actividad antiviral. La completa sulfatación de la posición 6 del residuo B-galactosa disminuye la actividad antiviral, sugiriendo que un grupo sulfato en esta posición dificulta la formación del complejo virus-polisacárido. Por otra parte, la actividad antiviral también se correlaciona con el peso molecular de la cadena, a mayor peso molecular, mayor actividad, sin embargo por arriba de los 100 kDa no se ha observado un incremento en la actividad (Damonte *et al.*, 2004; Gosh *et al.*, 2009).

La sulfatación adicional es efectiva únicamente en aquellos polisacáridos poco o nada sulfatados que tienen poca o nula actividad antiviral, sin embargo en aquellos con alta actividad antiviral y peso molecular en el rango adecuado (10-100 kDa) no cambia por sulfatación, posiblemente porque el nuevo grupo sulfato entra en los sitios no activos. Polisacáridos con grado de sulfatación menor del 20-22% generalmente no muestran actividad. Sin embargo un grado bajo de sulfatación no elimina la posibilidad de que tenga actividad debido a la distribución de estos grupos sulfato (Damonte *et al.*, 2004a).

2.1.2 Mecanismo de Acción Antiviral de los Polisacáridos Sulfatados

Recientemente, las diversas controversias acerca de la estructura molecular de los polisacáridos sulfatados, las glicoproteínas virales y los receptores de la superficie celular han sido resueltas, y muchos aspectos sobre la actividad antiviral han sido elucidados. Se ha demostrado que las propiedades antivirales de los polisacáridos sulfatados no son una simple función de densidad de cargas y longitud de la cadena, las características detalladas de la estructura de la molécula juegan un papel fundamental (Ghosh *et al.*, 2009).

El efecto inhibitorio de los polisacáridos sulfatados aparentemente está basado en su habilidad de interferir con las etapas iniciales de adhesión del virus con la célula blanco y consecuentemente bloquear la entrada del virus (Damonte *et al.*, 2004). Sin embargo también existen trabajos en donde se habla de un efecto inhibitorio en la replicación viral, por lo cual el efecto inhibitorio de estos compuestos podría estar actuando a varios niveles (Preeprame *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2010).

2.1.2.1 Inhibición de la Adsorción

Adhesión del compuesto al virus: El contacto inicial entre los virus envueltos y la célula hospedera ocurre mediante interacciones iónicas entre las regiones cargadas positivamente de las glicoproteínas virales y los constituyentes de la superficie celular cargadas negativamente. Los polisulfatos presentan una gran densidad de cargas negativas en su molécula debido a la presencia de residuos sulfato. Por lo tanto están aptos para interactuar con las glicoproteínas involucradas en la adsorción del virión. Se ha propuesto que no solo las cargas positivas de las glicoproteínas virales se encuentran protegidas por los polisulfatos, si no que añaden un potencial negativo adicional que

bloquea el contacto inicial virus-célula (Damonte *et al.*, 2004a). La eficacia de estos compuestos en las pruebas “*in vivo*” corresponden a su habilidad de inhibir la adhesión del virus con la superficie celular, así como en algunos casos la actividad virucida tiene un papel adicional (Ghosh *et al.*, 2009).

Carlucci *et al.*, 1997 analizaron la actividad antiviral contra HSV-1 y HSV-2 del galactán sulfatado aislado de *C. ramosa* en la línea celular Vero. Los resultados obtenidos muestran una inhibición viral con un IC₅₀ de 1.6-4.2 µg/ml y una CC₅₀ de 476 µg/ml. El modo de acción fue descrito como un efecto inhibitorio en la adsorción viral.

Hidari *et al* en 2008 utilizaron el fucoidán extraído de *C. okamuranus* contra el virus del dengue en la línea celular BHK-21, encontrando una potente actividad antiviral. La desulfatación del fucoidán mostró una supresión de la actividad inhibitoria. Así mismo la reducción carboxílica eliminó el efecto del fucoidán contra la infección del virus del dengue tipo 2. Estos resultados sugieren que los residuos de ácido glucorónico así como los fucosa sulfato son esenciales para la actividad inhibitoria del fucoidán. El fucoidán no logró inhibir el virus del dengue tipo 1 en las células BHK-21; estas observaciones indican que la actividad inhibitoria del fucoidán depende de las diferencias estructurales en las glicoproteínas de la envoltura basada en los residuos de aminoácidos los cuales podrían influir en la interacción del virus con el fucoidán (Hidari *et al.*,2008).

Ichiyama *et al.*, 2013 observaron que el curdlan sulfato inhibió efectivamente el virus del dengue en células LLC-MK2. Los resultados de microscopía electrónica muestran que el curdlan sulfato interactúa directamente con la envoltura viral y causa cambios en la superficie del virus. En los experimentos de tiempo de adición mostraron que el compuesto no solo inhibe la infección viral en el proceso de unión a la célula hospedera, sino que también en los eventos post-adsorción.

Adhesión del compuesto a receptores celulares: Se han considerado que las moléculas de los polisacáridos sulfatados actúan inhibiendo la entrada de virus envueltos, compitiendo por los receptores de la superficie celular, incluyendo el receptor heparán sulfato (Luscher-Mattli, 2000). Fuerzas electrostáticas son elementos

importantes en la interacción entre los receptores y la proteína de unión viral; se cree que las moléculas poli sulfatadas bloquean la unión a través de interacciones hidrofóbicas (Olofsson and Bergstrom, 2005).

En general los polisacáridos cargados negativamente inhiben la adsorción del virus en la membrana celular por interferencia de unión electrostática entre la envoltura viral y la membrana celular (Kimura *et al.*, 2000).

En algunos trabajos se ha mostrado al polisacárido sulfatado fucoidán como un ligando específico del receptor scraver (SR), mismo que se expresa en macrófagos. Se piensa que los sitios de unión de polianiones y los SR son lo mismo, por tal motivo se ha visto involucrado en la fagocitosis, endocitosis y adhesión (Platt and Gordon, 2001).

En otro trabajo realizado por Malhotra *et al* en el 2003, observaron que el fucoidán inhibió la infección de RSV uniéndose al receptor L-selectina de la célula hospedera, de esta forma la interacción entre la proteína G (receptor viral) y la L-selectina fue inhibida. También se encontró que inhibió la unión del VIH al receptor CD4 (Lynch *et al.*, 1994). El fucoidán actuó por competencia con el heparán sulfato (superficie celular) para unirse a los virus de la diarrea viral bovina (Iqbal *et al.*, 2000). El fucoidán inhibió a HSV-1 y HSV-2 y Citomegalovirus al agregarlo al mismo tiempo de la infección, inhibiendo así a los receptores celulares y/o virales (Zhu *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004).

2.1.2.2 Inhibición de Fusión

Los polisacáridos sulfatados no inhibieron únicamente la adsorción de VIH, sino también previnieron la formación de sincicios (células gigantes) inducidos por VIH (Witvrow and De Clercq, 1997). Este mismo mecanismo de acción se ha reportado contra Citomegalovirus y Herpes simple (Hayashi *et al.*, 1996; 2006).

Grassauer *et al.*, en 2008 probaron la actividad antiviral de Iota-carragenan, un polisacárido sulfatado proveniente de algas rojas (FMC Biopolymers), el cual mostró

una potente actividad anti HRV *in vitro*. El compuesto inhibió el efecto citopático (sincicios) producido por el virus en células HeLa infectadas con HRV.

En un trabajo realizado por Song *et al* en 2013 utilizaron el polisacárido sulfatado proveniente de *Chuanminshen violaceum* el cual mostró una actividad antiviral significativa contra el virus de la enteritis de los patos (DEV). En los ensayos de inmunofluorescencia directa y microscopía electrónica de transmisión demostraron que el mecanismo de acción del compuesto fue por interferencia en la adsorción viral. Así mismo, evaluaron la cantidad de virus inhibido durante la adsorción viral mediante qPCR lo cual reveló que el compuesto puede reducir significativamente los virus unidos a las células y que también impide la propagación célula-célula de DEV.

Romanos *et al* en 2002 evaluaron el efecto inhibitorio de un fucano sulfatado extraído del alga marina *Laminaria abyssalis* contra el virus linfotrófico humano de células T tipo 1 (HTLV-1). El compuesto inhibió en casi un 100% la formación de sincicios en la línea celular HeLa en cocultivo con la línea de células T infectada por HTLV-1 (C91/PL), el fucano fue capaz de inhibir el contacto célula-célula el cual es esencial para la propagación de HTLV-1.

2.1.2.3 Inhibición de la Replicación

El sulfato fucano extraído de *Sargassum horneri*, tomando como base su índice de selectividad, mostró un potente efecto inhibitorio de la replicación de HSV-1 cuando fue añadido después de a la infección (Preeprame *et al.*, 2001).

Experimentos realizados con fucoidán extraído de *F. vesiculosus* indican que inhibe tanto el estado inicial de la infección de VIH (la unión y la penetración a las células) como también estados posteriores de replicación después de la penetración del virus, ya que fue añadido después de la infección (Schaeffer and Krylov, 2000).

Chen *et al* en 2010 analizaron la actividad antiviral del polisacárido sulfatado proveniente de *Gracilaria lemaneiformis* contra el virus de la Influenza humana H1-364 observando un efecto inhibitorio a nivel de adsorción y replicación.

Nakashima *et al.*, en 1987 probaron la actividad antiviral contra HIV de un extracto proveniente de *S. pacifica*, el cual está compuesto de galactosa (73%), sulfonato (20%) y 3,6-anhydrogalactosa (0.65%). Los estudios de espectroscopía infrarroja y productos de hidrólisis sugieren que se trata de un λ -carragenán. El compuesto inhibió selectivamente la retrotranscripción y la replicación de HIV *in vitro*. Más del 92 % de la actividad de la RT fue inhibida con 2×10^3 IU/ml. Esta concentración estimuló la actividad de la DNA polimerasa *in vitro*, pero no tuvo efectos adversos en la incorporación celular de [3H]thimidina o [3H]uridina en el cultivo de células T humanas. Consecuentemente, se determinó que se trata de un inhibidor específico de la transcriptasa reversa por lo cual no ocasiona efectos adversos en el crecimiento celular.

2.1.3 Aplicaciones Clínicas de los Polisacáridos Sulfatados

A pesar de obtener efectos exitosos *in vitro* con los polisulfatos, su eficiencia *in vivo* en modelos animales y humanos debe ser demostrado (Damonte *et al.*, 2004a). El resultado del tratamiento de polisulfatos en modelos animales ha sido muy variable. Estudios realizados con el virus de la leucemia murina en ratones prueba la eficiencia de extractos crudos de algas marinas. El dextrán sulfato protege a los ratones contra HSV2, pero no es efectivo en gatos infectados con el virus de la leucemia felina y patos infectados con el Virus de la Hepatitis B (Damonte *et al.*, 2004a).

Considerando los efectos positivos de los polisulfatos contra VIH 1 y 2, éstos han sido probados como terapia. Desafortunadamente, la administración oral del dextrán sulfato y pentosa polisulfato en individuos infectados con VIH fue inefectiva. Para probar diferentes estrategias, se administró por vía intravenosa de manera continua. Bajo estas condiciones, se detectaron altos niveles de la droga en sangre pero no se

observaron efectos terapéuticos ni decremento en los marcadores de la infección (Damonte *et al.*, 2004). Todo esto remarca los serios obstáculos que debe superar los polisacáridos sulfatados para su uso clínico.

Se probó un extracto de *Undaria pinnatifida* en pacientes con infección activa de HSV-1; se les administró vía oral en cápsulas por un lapso de 24 meses sin otros medicamentos. Los pacientes registraron una inhibición del HSV-1 desde los 3 meses, sin presentar signos adversos en los 2 años que duró el estudio. El extracto de *Undaria pinnatifida* contiene polianiones y el mayor de ellos es el galactofucán sulfatado. Así mismo dos mujeres infectadas con HSV-2 tomaron la dosis de mantenimiento (2 cápsulas diarias) y encontraron alivio tras dos meses de tratamiento sin mostrar signos adversos (Hoshino *et al.*, 1998).

El fucoidán extraído de *Cladosiphon okamuranus* fue evaluado en 15 pacientes con hepatitis C (hepatitis crónica, cirrosis y carcinoma hepatocelular), se les administró 0.83 g/d durante 12 meses. Los resultados indican que los niveles de RNA de HCV disminuyeron significativamente en los pacientes tratados con fucoidán durante 8-10 meses y sin mostrar efectos adversos (Mori *et al.*, 2012).

También se ha determinado el efecto antiviral de los polisacáridos sulfatados en camarones (*Penaeus japonicus*) mediante la administración oral de fucoidán (extracto del alga café *C. okamuranus*) para el control del síndrome de mancha blanca (WSS), a concentraciones de 60 y 100 mg de fucoidán semipuro/ Kg de camarón por día, a través de un desafío *in vivo* por inmersión con el virus, presentando un 77% de supervivencia con un 100% de mortalidad en el control (Takahashi *et al.*, 1998).

2.1.4 Ventajas del Uso de Polisacáridos

Los polisacáridos sulfatados naturales son efectivos contra un amplio rango de virus envueltos, aunque el grado de inhibición varía con el tipo de polisacáridos y el virus.

- Tienen un alto índice de selectividad (IS) de acción antiviral (Damonte *et al.*, 2004).
- Tienen poca habilidad de inducir mutantes viral resistentes (Carlucci *et al.*, 2002; Damonte *et al.*, 2004, Grassauer et al., 2008).
- Tienen actividad contra las mutantes virales resistentes a otros agentes antivirales (Damonte *et al.*, 2004; Ghosh *et al.*, 2009).
- Una ventaja para el uso de algas como fuente de polisacáridos sulfatados es el alto contenido de estos poli-aniones en su matriz extracelular y que estos pueden ser preparados a muy bajo costo (Damonte *et al.*, 2004).
- Posible sinergismo con otros compuestos con actividad antiviral. En otra serie de experimentos encontraron sinergismo entre el fucoidán y AZT (azidotimidina) y los autores sugieren que esto puede permitir usar dosis terapéuticas menores de AZT (Schaeffer and Krylov, 2000).

2.1.5 Recursos Algales de México

México cuenta con 2 grandes regiones costeras, el Pacífico en donde existen alrededor de 1 100 de especies de macroalgas marinas y en el Atlántico alrededor de 800. En el Pacífico mexicano, frente a las costas de Baja California, se distribuye un gran número de especies de macroalgas de valor comercial: El alga parda *Macrocystis pyrifera*, y las algas rojas *Gelidium robustum* y *Chondracanthus canaliculatus* y en el Golfo de California se tiene la pesquería reciente de la especie *Gracilariopsis longissima*; cabe mencionar que todas estas especies se destinan como materias primas para la producción de ficocoloides (alginatos, agar y carragenanos) (Pacheco-Ruiz *et al.*, 2002). La investigación sobre las propiedades de las algas en México es apenas incipiente, a pesar de ser un país con una amplia zona costera. Se ha investigado la actividad antibiótica de 6 macroalgas marinas colectadas en la costa de Yucatán: de las cuales los extractos lipídicos y etanólicos de dos especies del género *Caulerpa*, han mostrado tener actividad contra bacterias Gram + (Freile, 2001).

En México, se ha iniciado la explotación y el cultivo del alga *Ulva clathrata* con fines de uso comercial tanto para nutrición humana como animal. La tecnología patentada por Sinaloa Seafields International Inc (NO.WO2006/002093) del cultivo de esta alga se lleva a cabo mediante una cepa pura cultivada en laboratorio, para posteriormente ser cultivada en cocultivo con camarones (Moll *et al.*, 2005).

2.2 Virus de la Enfermedad de Newcastle

NDV es el agente causal de una enfermedad altamente contagiosa en muchas especies de aves domésticas y silvestres. La enfermedad fue reportada por primera vez en Java en 1926 y atrajo la atención internacional en Newcastle Inglaterra en 1926 (Shope, 1964; Alexander, 2000). NDV se caracteriza por causar alteraciones respiratorias, digestivas y neurológicas en aves domésticas y silvestres. La severidad de estos síntomas varía desde una infección no perceptible hasta una infección fatal. Las diferentes cepas del NDV están categorizadas en base a su habilidad de causar alteraciones nerviosas, respiratorias, viscerales o letales (Alexander, 2000). Estas diferencias de virulencia son determinadas mediante la inoculación de huevos embrionados y pollos vivos. Las cepas de NDV son clasificadas como velógena (alta virulencia), mesógena (virulencia moderada) y lentógena (avirulenta), dependiendo de la severidad de la infección que causan (Alexander, 2000).

La enfermedad causada por el virus de Newcastle se encuentra en la mayoría de los países del mundo, posiblemente por el amplio rango de reservorios. NDV es un importante patógeno que afecta en gran medida a la industria avícola. Como medida preventiva se utiliza la vacunación de aves, por medio de la aplicación de una cepa lentógena B1 o La Sota. Sin embargo su uso puede producir desórdenes respiratorios y digestivos por lo cual se afecta la productividad general de estas aves.

2.2.1 Clasificación y Características Generales del NDV

El virus de la enfermedad de Newcastle está clasificado como el único miembro del género Avulavirus la cual pertenece a la sub-familia Paramyxovirinae de la familia Paramyxoviridae en el orden Mononegavirales (tabla 1). En esta familia también se incluyen virus patógenos de humanos y animales como sarampión, paperas, enfermedades respiratorias (virus Sincitial Respiratorio y Parainfluenza), Distemper Canino, Encefalitis (virus Hendra y Nipah).

Tabla I

. Miembros de la familia Paramyxoviridae

Miembros de la familia Paramyxovirus	
Ejemplos de Virus	
Orden Mononegavirales	
Familia Paramyxoviridae	
Subfamilia Paramyxovirinae	
Género Respirovirus	Virus parainfluenza bovina Virus parainfluenza humana tipo 1 Virus Sendai
Género Morbilivirus	Virus Distemper canino Sarampión
Género Rubulavirus	Virus Simian 5 Virus paperas
Género Henipavirus	Virus Hendra Virus Nipah
Género Avulavirus	Virus Enfermedad Newcastle
Subfamilia Pneumovirinae	
Género Pneumavirus	Virus respiratorio sincitial bovino Virus respiratorio sincitial humano
Género Metapneumovirus	Metapneumavirus aviar Metapneumavirus humano

El NDV es un virión pleomórfico con envoltura lipoprotéica que rodea a la nucleocápside de simetría helicoidal de 18 nm de diámetro con forma de “espina de pescado”. Es sensible al calor (56 °C), pH 3 y solventes lipídicos. Su genoma consta de una de RNA de cadena sencilla, lineal y de sentido (-) de 18 kb es transcrito por su transcriptasa (RNA-polimerasa dependiente de RNA) en 6 RNAm (+) para codificar los polipéptidos víricos (3'-NP-P-M-F-HN-L-5'); por otra parte, se sintetiza un RNA (+) para la replicación del RNA genómico (-) (figura 3).

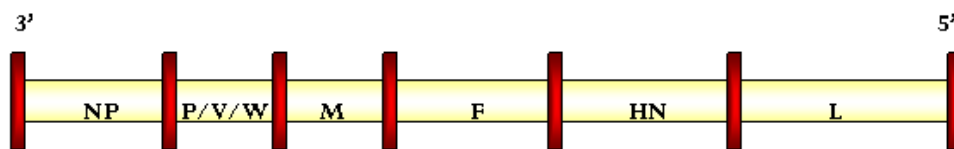


Figura 3. Representación esquemática del genoma del NDV.

Los 6 genes codifican para proteínas estructurales las cuales están clasificadas en componentes del core y de la membrana. Los componentes de la membrana consisten en dos glicoproteínas, las proteínas F y HN, y la proteína de matriz (M). Al interior de la envoltura viral, se encuentra la ribonucleoproteína del core (RNP), la cual está conformada por el RNA genómico asociado con la proteína de la nucleocápsida (NP) y el complejo de la polimerasa compuesto por la fosfoproteína (P) y la proteína L. En su envoltura se encuentran las glicoproteínas F (fusión) y HN (hemaglutinina, neuroaminidasa), responsables de la fusión y de la unión con la célula hospedera respectivamente (figura 4). La proteína F es responsable de la fusión de la envoltura viral y la membrana celular a través de diversos cambios conformacionales (Cathomen *et al.*, 1998; Lamb *et al.*, 2006). La proteína F es sintetizada inicialmente como un precursor F0 y posteriormente son cortados por proteasas celulares en las subunidades F1 y F2 necesarios para la infectividad del virus (Nagai *et al.*, 1976, 1991; Garten *et al.*, 1980). El corte de la proteína F0 es un determinante de la patogenicidad y de la infección de NDV (Nagai *et al.*, 1976). En las cepas avirulentas, la proteína F no puede ser cortado por la enzima celular tipo furina por lo cual el proceso de fusión no puede ser

completado hasta que se agregue una proteasa exógena como la tripsina para poder llevar a cabo el corte de F0 a su forma activa (Lamb *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2010).

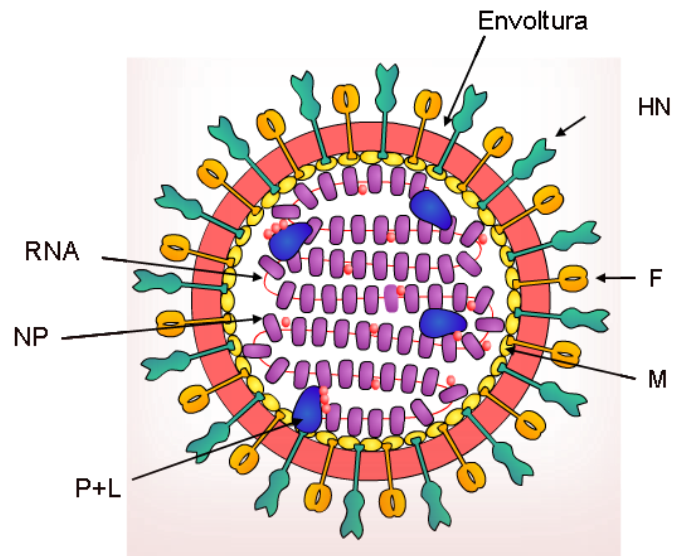


Figura 4. Esquema de los componentes típicos de un Paramixovirus.

2.2.2 Replicación del Virus de Newcastle

La infección por el virus de Newcastle se inicia con la unión del receptor viral con el receptor celular. La unión de la proteína HN con el receptor celular desencadena un cambio conformacional de la proteína F, la cual se encarga de la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula hospedera, lo cual se lleva a cabo a un pH neutro. Posterior a la fusión de las membranas lipídicas, la nucleocápside viral se disocia de la proteína M mediante un mecanismo desconocido y es liberado al citoplasma celular. El complejo de polimerización viral transcribe cada gen del RNA genómico. Posteriormente ocurre la traducción de los transcritos de RNA + y la síntesis del antígeno. Los productos de esta síntesis son utilizados para producir RNA's de

polaridad negativa, los cuales van a ser utilizados como RNA's genómicos (Lamb *et al.*, 2006).

Las nucleocápsides virales son ensambladas en dos pasos, primero la recién sintetizada NP se asocia con el RNA genómico naciente para formar la estructura de la nucleocápside helicoidal, y segundo el complejo de polimerasa P-L se asocia con la nucleocápside. Las glicoproteínas HN y F son sintetizadas en el Retículo Endoplásmico, y después de su maduración son transportadas a través del camino secretor (Lamb and Kolakofsky, 2001).

Todos los componentes virales, la nucleocápside, la proteína M y las glicoproteínas de envoltura son transportadas a la membrana plasmática y los viriones son ensamblados y liberados. Los componentes virales de NDV se encuentran concentrados en los rafts lipídicos de la membrana plasmática, por lo cual se sugiere que estos dominios específicos sirven como sitios para el ensamble y liberación viral (figura 5) (Laliberte *et al.*, 2006).

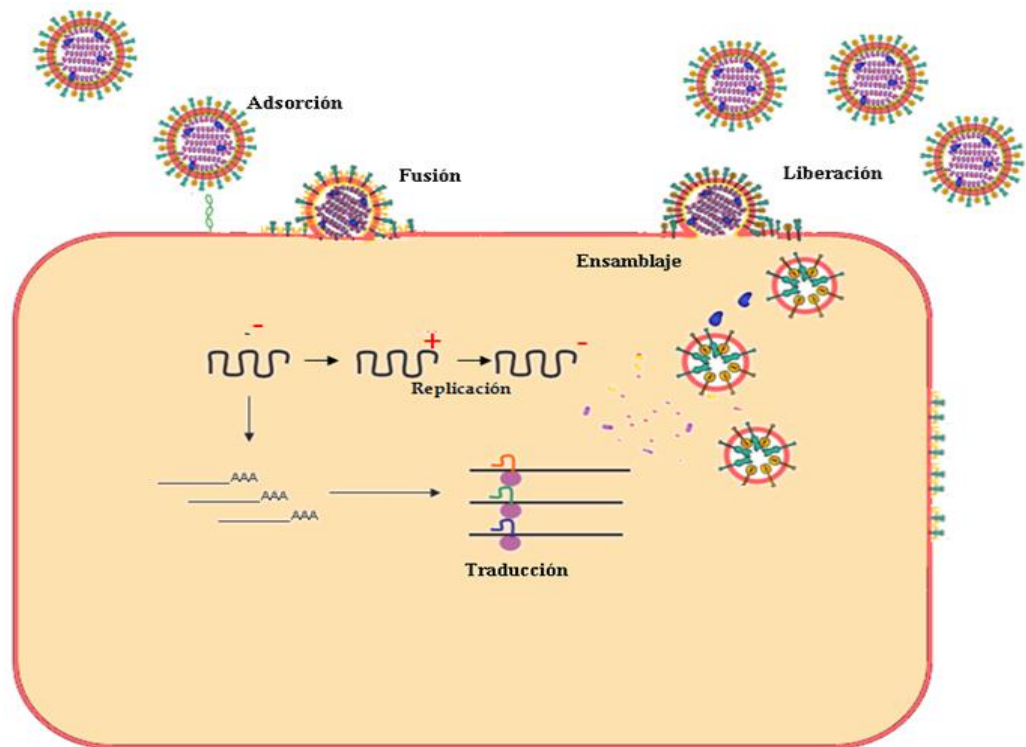


Figura 5. Ciclo replicativo general de los Paramyxovirus.

2.2.3 Características Histopatológicas Producidas por NDV

El virus se replica en el epitelio de la mucosa de los tractos intestinales y respiratorio superior, se difunde por vía hemática al bazo y la médula ósea, después se infecta el pulmón, intestino y sistema nervioso central, provocando anorexia, temperatura elevada, apatía, sed, plumas onduladas, cresta hemorrágica, ojos cerrados, faringe y laringe secas, estornudos, disnea, diarrea acuosa, descenso de la producción de huevos, huevos pequeños, blandos y albumen acuoso. Las aves sobrevivientes presentan signos nerviosos centrales (Alexander, 2000).

La producción de anticuerpos es rápida, la tasa de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación es una estimación del grado de inmunidad. El virus se aísla de bazo,

cerebro, pulmón o de embriones de 10 días, y se somete a las técnicas de inhibición de la hemaglutinación y de la hemadsorción para lograr un diagnóstico.

NDV se difunde por contacto directo entre aves, vía aerógena, transovárica, por alimentos crudos y agua contaminada. Para evitar su difusión se practica una buena higiene y vacunas atenuadas de cepas lentógenas en el agua para los pollos, y en las gallinas se aplican cada 4 meses, pero las aves no deben de ser movidas hasta 21 días después ya que el virus se encuentra en las heces hasta los 15 días. A pesar de este control, NDV sigue siendo una amenaza en los países industrializados y la causa de pérdidas importantes en los países en desarrollo (Fenner *et al.*, 1992); por tal motivo, es importante la búsqueda de un nuevo agente antiviral contra NDV.

2.3 Agentes Antivirales en la Industria Avícola

En la medicina veterinaria y en especial en la industria avícola, las infecciones producidas por virus constituyen una permanente amenaza para la salud de las aves, causando bajas en la productividad, con las consecuentes pérdidas económicas (Fenner *et al.*, 1992; Aldous *et al.*, 2003).

Se puede decir que los brotes de la enfermedad han disminuido considerablemente debido principalmente a los programas de vacunación que contemplan la aplicación de varias vacunas durante la vida del ave, pero, cuando se presentan fallas en los programas de vacunación, en los métodos de aplicación o el manejo de las vacunas, se han observado brotes serios de la enfermedad, tanto en pollos de engorda como ponedoras comerciales y reproductoras, significando que el virus patógeno está presente en el ambiente avícola (Alexander, 2000; Dortmans *et al.*, 2012).

Los productos antivirales existentes aún no son prácticos para su uso en la industria avícola. Además que el uso repetido e inadecuado de éstos podría provocar un

incremento de la resistencia de los virus que provocan esta enfermedad y que mutan con frecuencia.

Por ello, en la industria avícola urge disponer de sustancias antivirales efectivas, atóxicas para las células normales, y que además sean de fácil administración, disminuyendo gastos y estrés de las aves por manejo. Así mismo que estén disponibles a bajo costo, para tener protegida a toda la población en su corto periodo de vida.

2.3.1 Actividad Inhibitoria de Polisacáridos Sulfatados contra NDV

A la fecha diversos polisacáridos sulfatados han demostrado tener una potente actividad inhibitoria contra diferentes Paramyxovirus, incluyendo Virus Parainfluenza, Virus Sincitial Respiratorio, Virus del Sarampión, Virus de las Paperas y NDV (Hosoya *et al.*, 1991; Witvrouw *et al.*, 1997; Damonte *et al.*, 1994a; Hasui *et al.*, 1995; Hayashi *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2013).

Por otra parte, Nguyen *et al.*, en 2012, evaluaron la actividad antiviral contra NDV de polisacáridos extraídos de *Auricularia auricular* (hongo basidiomiceto), demostrando un mayor efecto antiviral cuando a los polisacáridos se les había añadido grupos sulfato. Wang *et al.*, en 2010 probaron el efecto contra NDV del polisacárido extraído de *Lycium barbarum* (planta fanerógama perteneciente a la familia Solanaceae) encontrando que la sulfatación de los polisacáridos aumentan significativamente la actividad antiviral.

Nuestro grupo de trabajo estudió el efecto del fucoidán de *C. okamuranus* sobre la replicación del NDV *in vitro* e *in ovo* obteniendo un índice de selectividad muy alto por lo tanto con baja toxicidad y alta efectividad (Rodríguez, 2009).

2.4 Generación de Mutantes Resistentes por Uso de Antivirales

Muchos de los fármacos antivirales apuntan a las diferencias entre los agentes virales y el huésped, tal es el caso de las proteínas virales encargadas de la entrada viral, la replicación, el ensamble y la liberación; teniendo así especificidad por las células infectadas. Sin embargo el tener como blanco una proteína viral específica no es siempre la mejor solución debido a la resistencia viral originada por mutagénesis cuando se trata de un solo blanco (Pillay, 2007). Por lo tanto las estrategias que apuntan a determinantes no proteicos de pasos importantes en el ciclo viral, y que además abarquen una amplia variedad de virus son altamente deseables. Por ejemplo los compuestos que tienen como blanco la fluidez de la membrana viral (Aguilar and Lee, 2011).

El desarrollo de la resistencia a agentes antivirales es considerado como una consecuencia natural de una rápida replicación viral en presencia de una presión selectiva. La rapidez con la cual surgen estos virus resistentes y la habilidad de permanecer en la población se ve influenciada por diversos factores entre los cuales se encuentran el agente antiviral utilizado y la habilidad por parte del virus de mutar y convertirse en resistente (Penn, 2009).

Por esta razón es fundamental evaluar el efecto de generación de mutantes de nuevas drogas así como su efecto antiviral sobre mutantes generadas por otros compuestos. Se recomienda la selección *in vitro* de virus resistentes a los productos que están siendo estudiados, así como realizar una caracterización fenotípica y genotípica y determinar la resistencia cruzada con otros antivirales antes de pasar a los ensayos clínicos en pacientes infectados. Además al identificar la(s) mutación(es) mediante un análisis en la secuencia del genoma de las clonas resistentes, se facilita la identificación del blanco y provee una validación en los estudios para determinar el mecanismo de acción del antiviral en estudio (FDA 2006).

Uno de los fármacos más utilizados es la ribavirina, el cual es un antiviral de amplio espectro utilizado particularmente contra el Virus Sincitial Respiratorio y el Virus de la

Hepatitis C, sin embargo también es utilizado para aquellas enfermedades causadas por virus de RNA para las cuales no hay tratamiento disponible (Snell, 2001). *In vitro* ha presentado actividad antiviral contra Paramyxovirus, Flavivirus, Picornavirus, Orthomyxovirus, Arenavirus, Reovirus, y Bunyavirus (Crotty and Andino, 2002; Crotty *et al.*, 2002; Elia *et al.*, 2008). Es un análogo de nucleósido de purina y su mecanismo de inhibición de la replicación viral no es completamente entendido. Está claro que la ribavirina interfiere en el metabolismo del RNA el cual es requerido para la replicación viral (Parker, 2005), causando una mutagénesis letal para virus de RNA (Crotty *et al.*, 2002). Para los Paramyxoviruses emergentes diversos resultados con ribavirina han sido reportados como la reducción de la mortalidad en un 36% durante el primer brote de NiV en Malasia (1998-1999) (Chong *et al.*, 2001). El complejo mecanismo molecular de la inhibición de la replicación viral por parte de la ribavirina (inducción de errores catastróficos y la depleción del GTP intracelular) podría no permitir un rápido desarrollo de más análogos potentes (Leysen *et al.*, 2008; Aguilar and Lee, 2011).

La amantadina fue el primer antiviral sintético en mostrar un efecto inhibitorio de la replicación viral del virus de la Influenza. La amantadina bloquea la migración de iones H^+ al interior de la partícula viral dentro del endosoma, un proceso que es necesario para la liberación del genoma. Ha sido utilizada en el tratamiento contra la infección de influenza A; sin embargo su uso se ha limitado debido a la rápida emergencia de resistencia y los efectos secundarios en el sistema nervioso central (De Clercq, 2006). Se ha reportado un efecto inhibitorio en Paramixovirus como Virus Sincicial Respiratorio y Parainfluenza solo a dosis altas (arriba de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Couch and Six, 1985).

Los polisacáridos sulfatados han demostrado tener actividad contra diversos virus envueltos, entre ellos los Paramyxovirus. Diversos reportes muestran la poca habilidad de producir mutantes virales resistentes. Este *et al.*, en 1997 realizó pases seriados de células MT-4 infectadas con HIV-1 en concentraciones crecientes de dextrán sulfato; así mismo Carlucci *et al* utilizó carragenán contra HSV y ambos observaron una baja inducción de resistencia viral (Carlucci *et al.*, 2002). Los polisacáridos sulfatados, en contraste con antivirales comerciales los cuales inducen a una rápida resistencia viral, requieren de numerosos pases para obtener variantes virales con reducida

susceptibilidad. El aislamiento de mutantes virales resistentes a los polisacáridos sulfatados es muy lento pero consistente lo cual indica que existe una interacción específica entre el virus y el polisacárido. Además se observó que mutantes de VIH y HSV resistentes a medicamentos de uso clínico eran susceptibles a dextrán sulfato y carragenán respectivamente lo cual nos sugiere un posible uso de los polisacáridos sulfatados en combinación con los fármacos actualmente utilizados (Este *et al.*, 1997; Carlucci *et al.*, 2002). Así mismo, a pesar de que las variantes resistentes de HIV emergen relativamente rápido, Grausser *et al.*, (2008) no encontraron diferencias en las pruebas realizadas *in vitro* entre el stock viral original y el stock de HRV expuesto a Iota-carragenán durante 10 pases subsecuentes con concentraciones entre 7 µg/ml y 20 µg/ml. Los resultados indican que el escape de mutantes resistentes a Iota-carragenán no ocurre frecuentemente en la línea celular HeLa.

3. JUSTIFICACIÓN

La exploración de nuevas sustancias como candidatos para fármacos antivirales es fundamental debido a la carencia de estos para la mayoría de las infecciones virales en salud pública y veterinaria y a los crecientes riesgos de emergencia y reemergencia viral. Las algas marinas contienen varios metabolitos con actividad biológica que se reconocen como agentes antivirales prometedores.

En medicina veterinaria y en especial en la industria avícola, las infecciones producidas por virus constituyen una permanente amenaza para la salud de las aves, causando serias bajas en la productividad, con las consecuentes pérdidas económicas.

La enfermedad de Newcastle es probablemente una de las enfermedades más infecciosas de las aves de corral en todo el mundo. Es causada por el Virus de Newcastle (Paramyxovirus), y debido a su alta morbilidad y mortalidad genera cuantiosas pérdidas económicas. Su incidencia ha disminuido gracias a los programas de vacunación; sin embargo, cuando se presentan fallas en la aplicación o manejo de las vacunas, se registran serios brotes de la enfermedad.

En este trabajo, en base a la necesidad de desarrollar nuevos antivirales para la industria avícola que sean efectivos, no tóxicos, de fácil administración y de bajo costo, evaluamos la acción antiviral de polisacáridos sulfatados derivados de algas sobre el virus de Newcastle (NDV) y su mecanismo de acción, además caracterizamos las mutantes virales inducidas por el compuesto y evaluamos su efectividad en contra de las mutantes resistentes a la ribavirina (antiviral de uso comercial). Conforme a nuestros resultados pretendemos proponer a los polisacáridos sulfatados como preventivos y/o terapéuticos en las infecciones por NDV.

4. HIPÓTESIS

Los polisacáridos sulfatados de algas marinas ejercen su actividad antiviral contra NDV al bloquear los procesos de entrada y/o replicación viral; además, inducen a muy baja frecuencia la selección de mutantes resistentes y no afectan las células hospederas.

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el mecanismo de acción antiviral de los polisacáridos sulfatados (fucoidán y/o ulván) derivados de algas marinas sobre el Virus de la Enfermedad de Newcastle, su tendencia de inducción de mutantes, la caracterización de estas, así como la susceptibilidad de las mutantes resistentes a la ribavirina al compuesto.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Evaluar la actividad inhibitoria de los polisacáridos sulfatados contra NDV.
- 2.- Determinar el mecanismo de acción antiviral ejercido por el polisacárido sulfatado seleccionado contra NDV.
- 3.- Inducir y seleccionar mutantes de NDV resistentes al efecto inhibitorio del polisacárido sulfatado seleccionado y de la ribavirina.
- 4.- Secuenciar los genes HN y F de las mutantes resistentes al efecto antiviral del polisacárido sulfatado seleccionado para determinar la región en la cual se está ejerciendo la presión selectiva.
- 5.- Determinar la susceptibilidad al polisacárido sulfatado de mutantes generadas por la ribavirina.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1 Diseño Experimental

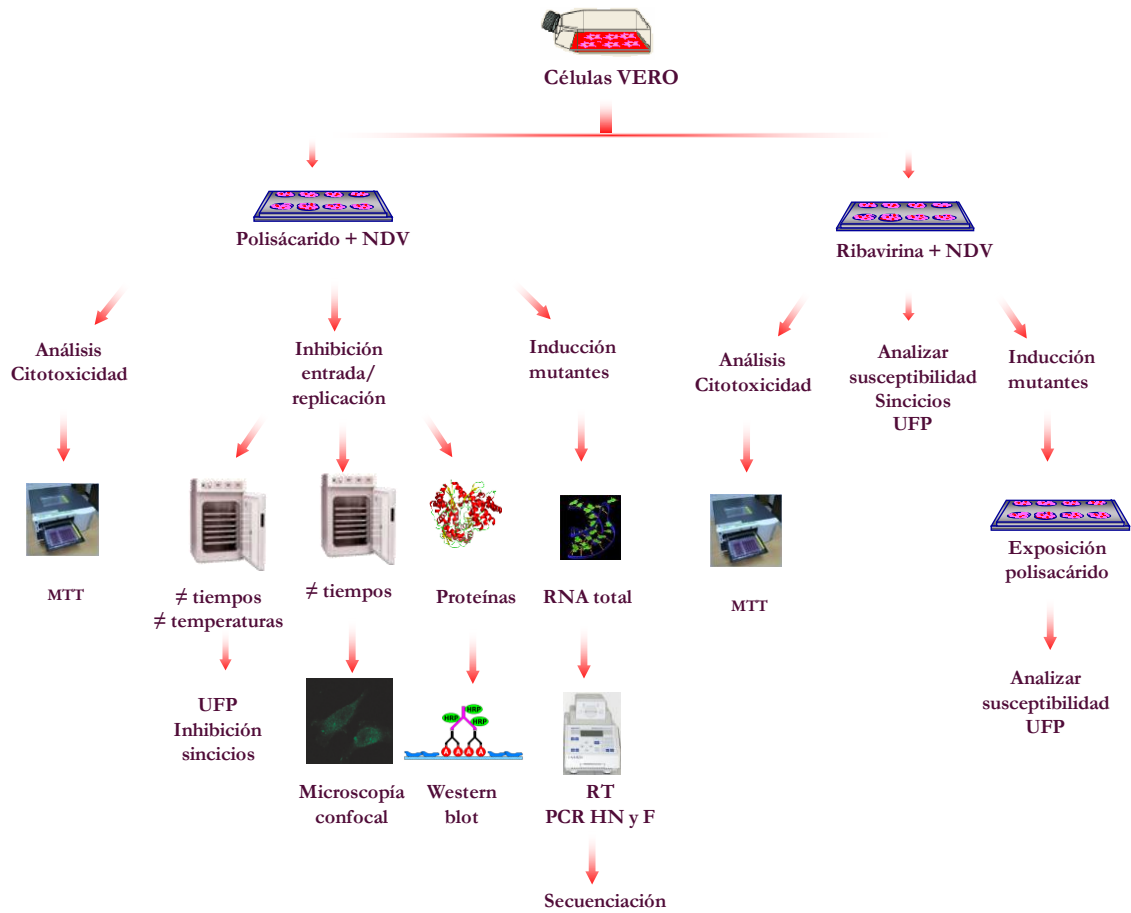


Figura 6. Estrategia general del desarrollo del trabajo de tesis.

6.2 Preparación de los Extractos

El fucoidán de *Cladosiphon okamuranus* y los extractos acuosos de *Macrocystis pyrifera* y de *Ulva clathrata*, fueron proporcionados por la Dra. Elizabeth Cruz Suárez del Programa de Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

La equivalencia de carbohidratos de los extractos con respecto al Fucoidán de *C. okamuranus* se determinó mediante el método antrona, teniendo una relación 1:3 con *U. clathrata* y 1:4 con *M. pyrifera*, estos datos fueron proporcionados por el Dr. Alberto Peña Rodríguez del Programa de Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. El fucoidán de *C. okamuranus* y los extractos de *M. pyrifera* y de *U. clathrata* se resuspendieron en medio D-MEM/F12 por separado para tener un stock de 2500 µg/mL de azúcar, posteriormente se esterilizaron con un filtro de 0.45 µm y se mantuvieron en refrigeración hasta su uso. A partir del stock se realizaron las diluciones en medio D-MEM/F12 para obtener las concentraciones seleccionadas para cada ensayo.

6.3 Evaluación del Efecto Citotóxico de los Compuestos

6.3.1 Cultivo de Células VERO (Riñón de Mono Verde Africano)

Las células VERO fueron cultivadas en botellas de 25 cm² con medio DMEM/ F12 suplementado con SFB al 10% a 37 °C, 5% de CO₂ y condiciones de humedad controlada y fueron transferidas cuando alcanzaron un 90% de confluencia.

6.3.2 Obtención de Cultivo Primario de Fibroblastos de Embrión de Pollo (CPFEP)

Se utilizaron embriones de 9 días, se observaron a través de un ovoscopio para determinar viabilidad, se señaló la cámara de aire, se desinfectaron con etanol al 70% y en condiciones de esterilidad (dentro de una campana de flujo laminar) se retiró el casquete para sacar al embrión con la ayuda de una pinza, se colocó en una caja de petri, se lavó 2 veces con PBS 1%. Se retiró la cabeza, patas, vísceras y columna vertebral, el tejido restante se transfirió a una jeringa de 5mL y se filtró a través de un embudo con gasa para depositarse en un matraz el cual contenía 20mL de EDTA-tripsina al 0.025% en PBS al 1%. Se agitó 3 min. a velocidad media, sin hacer espuma, se dejó sedimentar, se decantó el sobrenadante. Se agregó 15mL de EDTA-tripsina al 0.025% en PBS al 1%. De nuevo se agitó por 10 min. y se dejó sedimentar, se tomó el sobrenadante para colocarlo en un tubo (Falcon 50mL) que contenía 5mL de suero fetal bovino frío para detener la disgregación. Esto se realizó dos veces para obtener mayor cantidad de fibroblastos. Después, el tubo de 50 mL se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min. el sobrenadante se eliminó y al paquete celular se le agregó 4 mL de D-MEM/F12 con SFB 10% y se resuspendió lentamente.

Para realizar el conteo celular: se tomaron 20 μ L, se mezclaron con 20 μ L de azul de tripán y se observan en la cámara de Neubauer. Después se estandarizó a 1.5×10^5 células por mL y se agregó 1 mL por botella de cultivo de 25 cm² (a 4 botellas), las cuales contenían 4 mL de medio D-MEM/F12 con suero fetal bovino (SFB) al 10%. Se les permitió propagarse a 37° C y 5% de CO₂ hasta obtener una confluencia del 90%.

Después, se obtuvo el cultivo secundario de fibroblastos de embrión de pollo (CSFEP) disgregando las células de CPFEP con 2 mL de EDTA-tripsina atemperada. Se dejaron propagar hasta que se observó una confluencia del 90% para los ensayos.

6.3.3 Determinación del Efecto de los Extractos Sobre la Viabilidad Celular en CSFEP y Células VERO por la Técnica Colorimétrica MTT

Los cultivos celulares fueron transferidos a placas de 96 pozos (15000 células por pozo), y se incubaron a 37° C y 5% de CO₂ hasta obtener una confluencia de 80-90%. Se agregaron 100 µl de los compuestos por pozo a diferentes concentraciones: 0.1, 1, 10, 100, 250, 500, 1000, 1500 µg/ml. Se incubó durante 48 h a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente se les eliminó el medio y se agregaron 22 µl de la solución de MTT (0.05 g/ml) a cada pozo y se incubaron a 37°C durante 2.5 horas. Se les eliminó el MTT y se reemplazó por 100 µl de DMSO (dimetilsulfóxido) y se incubaron durante 8 minutos, posteriormente se midió la absorbancia a 570 nm en el lector de ELISA.

6.4 Efecto Antiviral

6.4.1 Propagación del Virus NDV en Embrión de Pollo

Para la propagación viral se utilizó una vacuna de Virus Newcastle cepa La Sota (Agrovet), así como una cepa de campo proporcionada por la ganadera. Se inocularon 0.2 mL del virus vía alantoidea a 3 embriones de 9 y se incubaron a 37 °C por 72 h. Al término de este tiempo se cosechó el líquido alantoideo, se centrifugó a 800 rpm por 10min, se recolectó el sobrenadante, se seccionaron alícuotas de 60 µl cada uno y se congelaron a -70 °C.

6.4.2 Titulación del NDV

6.4.2.1 Titulación del NDV por Hemadsorción

En cajas de 96 pozos se sembraron 15000 células por pozo y se dejaron incubar a 37 °C y 5% de CO₂ hasta obtener una confluencia del 90%. Se eliminó el medio y se realizaron diluciones en base 10 de NDV en D-MEM/F12 a partir de 1:10 hasta 1:10⁹. Se agregaron 100 µL de las diluciones virales (6 repeticiones de cada dilución). Se incubaron durante 1h a 37 °C. Se eliminó el medio y se colocaron 100 µL de la suspensión al 0.5% de eritrocitos de humano tipo “O” a cada pozo. Se incubaron a 37 °C por 1h. Posteriormente se eliminó la solución de eritrocitos y se realizaron dos lavados con PBS 1X y se observaron las rosetas (sincicios rodeados por eritrocitos, unidos por el receptor HN) en el microscopio invertido y se realizaron los cálculos siguiendo el método de Reed y Muench.

$$\text{Índice} = \frac{(\% \text{ dilución arriba del } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ dilución arriba del } 50\%) - (\% \text{ dilución abajo del } 50\%)}$$

6.4.2.2 Titulación por Unidades Formadoras de Placas (UFP)

En placas de 6 pozos se sembraron 300,000 células VERO, estas fueron incubadas a 37 °C con 5% de CO₂ hasta obtener 80-90 % de confluencia, posteriormente fueron infectadas con 200 µL de diluciones seriadas al doble de NDV; se incubaron durante 1 h a 37 °C con 5% de CO₂, se retiró el inóculo y se cubrieron con 2 mL de agar (MP Biomedicals Cat No 194615 Lot No R19854) al 0.6%, para ser incubadas por 72 h en ambiente controlado, al término de lo cual se retiró el agar, se fijaron con metanol-acetona 1:1 durante 30 min. y se tiñeron con cristal violeta al 1% para cuantificar las UFP. Se realizaron por triplicado.

6.4.3 Prueba de Inhibición de Sincicios

En placas de 12 pozos se colocaron 50 000 células por pozo de la línea celular VERO y se incubaron a 37 C y 5 % de CO₂ hasta obtener 90% de confluencia. Se les removió el medio DMEM/F12 y se les agregó el fucoidán o el extracto a diferentes concentraciones (0.1, 1, 10 y 100 µg /mL) en un volumen de 500 µL por cada pozo (tres pozos por dilución), se incubaron a 37° C por 1h. Posteriormente se infectaron con virus Newcastle (880 DICT₅₀), se dejaron incubar por 1 h a 37 °C, se les retiró el inóculo y se les agregó 1ml de medio DMEM/F12 con 10% de suero fetal bovino y 1% antibiótico y se dejaron incubar por 24 hrs. Pasado el tiempo de incubación se retiró el medio y se sustituyó con 300 µl de medio-tripsina al 1%, se incubó por 30 min. posteriormente se eliminó el medio-tripsina y se agregaron 500 µl de medio. Cuando el control viral presentó el efecto citopático característico del virus Newcastle (sincicios), a las 24 hrs aproximadamente, se retiró el medio de los pozos, se fijaron con metanol-acetona y fueron teñidos con cristal violeta 0.1%. Se realizó el conteo de sincicios en 10 campos y la cantidad de núcleos de cada sincicio. Se calculó la significancia a partir del SPSS 10 por medio del análisis Dunnet.

6.4.4 Prueba de Inhibición Viral por Medio de UFP

Se plaquearon 300 000 células por pozo en placas de 6 pozos, y al obtener una confluencia del 80-90 % se infectaron con 100 UFP y se adicionó al mismo tiempo el fucoidán de *C. okamuranus* a diferentes concentraciones, en un volumen total de 200 µl y se incubaron por una hora a 37°C con 5% de CO₂. Después de la adsorción, la solución conteniendo ambos, compuesto y virus fue removida y se les agregó agar al

0.6% en medio DMEM y se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂. Después de 72 horas, se retiró el agar, y se fijaron con metanol acetona por 30 min. a -20 y se tiñeron con cristal violeta.

6.4.5 Prueba de Inhibición del Efecto Citopático de los Agentes Antivirales a Diferentes Tiempos de Infección

Se colocaron 150 000 o 300 000 células VERO por pozo en placas de 12 o 6 pozos respectivamente y se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ hasta obtener 80-90 % de confluencia. Se eliminó el medio de los pozos y se agregó diferentes concentraciones del antiviral a diferentes tiempos de la infección de NDV y se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂, posteriormente se retiró el tratamiento y se infectaron con 100 UFP o con 880 DICT₅₀ de virus NDV. Se retiró el inóculo después del tiempo establecido para la adsorción, y se agregaron 2 mL de agar al 0.6% en medio DMEM por pozo para el caso del análisis de UFP o 2 ml de medio DMEM para la inhibición de sincicios y se incubaron en un ambiente controlado, a 37° C con 5% de CO₂. Se realizaron 3 ensayos independientes.

6.4.6 Pruebas de Inhibición de la Fusión Celular

Se utilizaron placas de 12 pozos, en donde se propagaron células VERO hasta obtener 90% de confluencia, se les removió el medio DMEM/F12 y se infectaron con 880 DICT₅₀, se dejaron incubar por 1 hr a 37 °C. Se retiró el inóculo y se agregó 2 ml de DMEM y se incubó por 12 horas. Posterior a esto, se colocó 10 µg/ml del fucoidán antes o después de la tripsinización (en donde se colocan 200 µl de medio DMEM y tripsina al 1 % durante 20 minutos a TA). Se removió el medio con tripsina y se colocó 2 ml DMEM y se incubó a 37 C por 12 horas. Las células se fijaron con metanol-

acetona por 20 minutos y se tiñeron con cristal violeta. Se realizó el conteo de sincicios en 10 campos y la cantidad de núcleos de cada sincicio.

6.4.7 Pruebas de Inhibición de la Penetración Viral

La penetración del virus a la línea celular Vero fue evaluada de acuerdo al método reportado por Huang and Wagner (Huang and Wagner, 1964). En placas de 6 pozos, se colocaron 300 000 células por pozo de la línea celular Vero y se incubaron a 37 °C hasta obtener una confluencia del 90 %. Posteriormente se colocaron a 4 °C por tres horas y se infectaron con 100 UFC a 4 °C en ausencia del fucoidán. Se realizaron tres lavados con PBS frío, se agregaron diferentes concentraciones de fucoidán y se cambió la temperatura a 37 °C. Después de 1 hora de incubación a 37 °C, las células se trataron con buffer de citrato 40 mM pH 3.0 para inactivar los virus que no hubiesen entrado. Se colocó DMEM con 0.6 % de agar en medio DMEM y tripsina, se incubó a 37 °C y se realizó el conteo de UFP.

6.4.8 Extracción de Proteínas

Se obtuvieron los extractos proteicos de los ensayos realizados con el fucoidán a diferentes tiempos de la infección. Después del ensayo, se removió el medio de cultivo y se adicionó PBS 1X+EDTA 1mM. Se desprendió la monocapa de los pozos con ayuda de un “scraper” y se colocó en un tubo eppendorf, se centrifugó a 4 °C por 1 minuto. Se le agregó buffer de Lisis Completo y se incubó en hielo por 20 minutos. Se centrifugó a 13000 rpm. durante 5 minutos a 4 °C y se colectó el sobrenadante, el cual se almacenó a -70 °C hasta su análisis.

I) Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

a) Preparación de la curva estándar.

- Se preparó en agua estéril una solución stock de Albúmina Sérica Bovina (BSA) a una concentración de 100 mg/ml.
- Se realizó una dilución de 1:50 del stock de 100 mg/ml, para que quedara a una concentración final de 2 mg/ml ó 2 µg/µl.
- Se prepararon directamente en las celdas de plástico los estándares empleando el stock diluido de BSA.
- Se adicionaron 200 µl del reactivo de Bradford concentrado a cada celda y se mezcló.
- Se midió la absorbancia a 595 nm en el biofotómetro.

b) Preparación de la muestra.

- Para determinar la concentración de proteínas en la muestra problema se colocaron 2 µl del extracto de proteínas más 798 µl de agua. Se adicionaron 200µl del Reactivo de Bradford y se tomó lectura en el biofotómetro en el cual se realizó la curva estándar previamente. La concentración de proteínas leída por el aparato se dividió entre dos, debido a que se colocaron 2 µl de extracto de proteínas de la muestra.

6.4.9 Western blot

Para determinar los niveles de las proteínas virales de las células VERO infectadas con NDV y tratadas con el fucoidán a diferentes tiempos de la infección, se realizaron ensayos de Western blot.

6.4.9.1 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se realizó la electroforesis con 50 µg de proteína total, la cual se desnaturalizó en buffer de carga (4% SDS, 20% Glicerol, 0.2% azul de bromofenol, 200 mM b-mercaptoentanol, 100 mM Tris-HCl pH 6.8) a 94 °C por 5 minutos.

Se armó el cassette para el gel de la electroforesis vertical. Se preparó la solución del gel separador, con una concentración del 10% y se colocó en el cassette, después se cubrió el gel con isopropanol absoluto por aproximadamente 10 minutos. Se invirtió el gel para remover el exceso de isopropanol. Se preparó la solución del gel concentrador al 5% y se colocó en el cassette hasta el límite del vidrio e inmediatamente se acomodó el peine. Se colocó el gel en la cámara de corrimiento y se añadió el buffer de corrida 1X. Se retiró el peine y se lavaron los pocillos con buffer de corrimiento para eliminar la acrilamida no polimerizada. Se cargaron las muestras y se corrió la electroforesis por aproximadamente 2 horas a 80 Volts.

6.4.9.2 Transferencia a Membrana de Nitrocelulosa

Se utilizó un bastidor GIBCO para la transferencia de las proteínas. Se cortó una membrana de nitrocelulosa de 6 cm X 8.5 cm aproximadamente. Se lavó con agua destilada por 5 minutos y se colocó en buffer de transferencia 1X durante 10 minutos. También se colocó en buffer de transferencia 1X dos piezas de papel filtro y 4 esponjas. Del gel de la electroforesis se eliminó el gel concentrador y se colocó sobre el papel filtro húmedo y se despegaron el gel separador del vidrio. Se colocaron dos esponjas, el papel filtro y el gel sobre el set de transferencia. Se armó un “sándwich” colocando sobre el gel de la membrana previamente equilibrada. Se colocaron sobre la membrana el papel filtro húmedo y se eliminaron las burbujas formadas entre el gel y la membrana y se colocaron dos esponjas húmedas. La secuencia de transferencia fue en dirección de

polos negativo a positivo (Esponjas–papel filtro–gel de poliacrilamida–membrana de nitrocelulosa–papel filtro–esponjas) (figura 7). Se colocaron en un buffer de transferencia y se corrió en la cámara de transferencia a 35 V por hora y media.

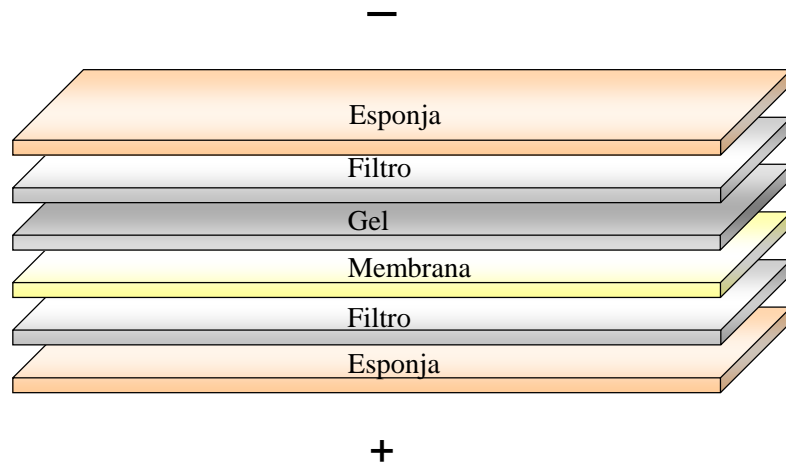


Figura 7. Representación gráfica de la transferencia de las proteínas en dirección de polo negativo a positivo.

6.4.9.3 Inmunodetección

Se colocó rojo de Ponceau a la membrana a fin de observar si se realizó de manera correcta la transferencia. Se lavó con buffer TBS-Tween 2 veces durante 5 minutos. Se colocó la membrana de nitrocelulosa en la solución de buffer de bloqueo durante 1 hora a T.A. Posteriormente se colocó la membrana con el anticuerpo monoclonal anti-HN de Newcastle (dilución 1:500 de Chemicon International CA) o con el anticuerpo monoclonal anti-GAPDH (dilución 1:500 Chemicon International CA) y se incubó toda la noche a 4 °C. Se lavó 3 veces con el buffer de lavado por 10 minutos a T.A. Se colocó el anticuerpo conjugado anti ratón IgG (dilución 1:1000 Chemicon International CA, USA), el cual se dejó incubar durante dos horas a T.A. y se lavó tres veces con buffer de lavado durante 10 minutos a T.A. Se escurrió la membrana, se agregó en partes iguales el reactivo A y B del kit de quimioluminiscencia (Roche) y se mantuvo en agitación

durante 5 minutos. Se escurrió la membrana para eliminar el exceso de solución y se colocó la membrana con las proteínas hacia el plástico y se eliminaron las burbujas. Se colocó la membrana con el plástico en el chasis y se expuso la membrana en el cuarto oscuro a un film el tiempo necesario. El análisis densitométrico de las bandas de proteínas detectadas por Western blot se llevó a cabo con el software Phoretix 1D v2003.02.

6.4.10 Inmunofluorescencia

Se colocaron 300 000 células Vero en cubreobjetos colocados en placas de 6 pozos, se le agregaron 100 µg/mL de fucoidán a diferentes tiempos de la infección (-60, 0, 15 y 60 minutos post-infección) e infectaron con 100 UFP de NDV. Se lavaron 3 veces con PBS, se les agregó medio DMEM e incubaron durante 12 horas a 37C. Posteriormente se fijaron con metanol-acetona 1:1, se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con solución de bloqueo (PBS con 1% de BSA) durante 30 minutos. Se lavaron e incubaron durante 2 horas con el anticuerpo monoclonal anti-HN de Newcastle (dilución 1:100 Chemicon International, CA). Se lavaron 3 veces con PBS/Triton y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo bovino anti-ratón IgG-FITC (dilución 1:100 Santa Cruz). Se lavaron 3 veces más con PBS/triton, y los cubreobjetos se montaron con Vectashield y se visualizaron utilizando el microscopio confocal laser (Olympus IX70, USA).

6.4.11 Análisis de la Inhibición de la Replicación en Embriones de Pollo

6.4.11.1 Inoculación del Virus y/o Fucoidán Vía Alantoidea

Se utilizaron embriones de 9 días. Se trasluminó cada huevo con ayuda del ovoscopio a fin de determinar su viabilidad, se delimitó la cámara de aire, se desinfectó y perforó el sitio de inoculación. Se inocularon los embriones con 4 y 16 μg de fucoidán por embrión, se agitaron cuidadosamente y se incubaron por una hora. Posteriormente se infectaron con 10 000 DICT₅₀ del virus NDV en 0.1 ml de DMEM a cada embrión, se agitaron cuidadosamente y se selló la perforación. Se dejaron incubar a 37 °C con movimiento regular por 72 horas.

6.4.11.2 Extracción RNA

Después del periodo de incubación (72 horas), se realizó la necropsia de los embriones y se colectaron las vísceras. Se colocaron las vísceras en un mortero, se les adicionó 0.5 ml de trizol y se maceraron con ayuda de nitrógeno líquido. Posteriormente el lisado se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml. y se incubó 5 min. a T.A. Se añadieron 100 μl de cloroformo y se mezclaron por inversión 15 segundos. Se incubaron en hielo de 2 a 3 minutos y se centrifugó a 13000 rpm. durante 15 minutos a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa y se adicionaron 250 μl de isopropanol e incubaron a -70 °C por 15 minutos. Después se centrifugó a 13000 rpm. durante 10 minutos a 4 °C, se removió el sobrenadante y se lavó la pastilla con 250 μl de etanol al 70%. Se centrifugó por 5 min. a 4 °C. Se secó la pastilla por 5 minutos y se resuspendió en agua DEPC.

6.4.11.3 Transcripción Inversa

Se utilizó el kit de Applied Biosystem High-Capacity cDNA Archive Kit para las Transcripciones reversas de los RNAs obtenidos de las vísceras de los embriones de pollo inoculados con NDV y tratados con fucoidán. Se preparó una mezcla con 2 μl del Buffer RT 10X, 0.8 μl de dNTP's Mix (100 mM), 2 μl de Random Primers 10 X, 1 μl de MultiScribe RT 50U/ μl y 4.2 μl de H₂O. Además se realizó una dilución 1:10 del

RNA extraído. Se mezclaron los 10 µl del mix y 10 µl de la dilución para dar un volumen total de 20 µl. Se incubó a 25 °C por 10 minutos seguido de un periodo de incubación de 2 horas a 37 °C. El cDNA obtenido se cuantificó y se almacenó a -70 °C hasta su uso.

6.4.11.4 PCR Semicuantitativo

Se preparó una mezcla en un tubo eppendorf con lo siguiente:

2.5µL del Buffer 10X sin Mg, 0.5 µL de dNTPs (10 mM), 0.6 µL TaqDNA Polimerasa (5UI), 0.7 µL MgCl₂ (1mM), 2 µL Primer F de NDV (25 pmol) 2 µL Primer Rev de NDV, 2µL de cDNA (200 ng) (tabla II) y se aforó a 25 µL con agua DEPC (por muestra) (tabla V).

El cDNA fue amplificado con ciclos apropiados de PCR (26, 28, 30 y 32 ciclos) consistiendo de 7 minutos a 94 °C seguido de ciclos de 95 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos y 72 °C por 1 minuto, finalmente a 72 °C por 10 minutos (tabla III). Se utilizó el set de primers reportado por Farkas *et al* (2007) para amplificar una porción del gen de fusión de NDV (316 pb). Para el análisis semicuantitativo, se realizó una RT-PCR en paralelo para β-actina. El set de primers utilizado fue FW 5'- 5'-TGGGAAGATGCAGCARTTTG-3' Rev 5'-RCCCAAGAGTTGAGTCTGTGA-3' (316 pb) (tabla IV). Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % de los productos amplificados obtenidos. Los productos de la amplificación fueron visualizados bajo luz UV y fotodocumentados. Las bandas obtenidas fueron analizadas por medio del programa Phoretix 1D V2003.02.

Tabla II

Oligonucleótidos utilizados para el PCR de NDV

NDV-F	5'-TGGGAAGATGCAGCARTTTG-3'
NDVF-rev	5'-RCCCAAGAGTTGAGTCTGTGA-3'

Tabla III

Condiciones de PCR Semicuantitativo para NDV

Temperatura	Tiempo	
94 °C	7 minutos	} 26, 28, 30 y 32 ciclos
95 °C	30 segundos	
58 °C	30 segundos	
72 °C	60 segundos	
72 °C	7 minutos	

6.4.12 Inducción de Mutantes de NDV al Polisacárido Sulfatado o Ribavirina

Se colocaron 300 000 células Vero por pozo en cajas de 6 pozos y se incubaron a 37 °C hasta alcanzar una confluencia del 90 %. Posteriormente se infectaron con 880 DICT₅₀ y se trataron con fucoidán. Se incubaron a 37 °C con agitación periódica. Se removió el sobrenadante y se lavaron las células 3 veces con PBS. Se agregó medio DMEM/F12 e incubaron a 37 °C durante 24 horas o 48 horas hasta observar la formación de sincicios (3 o 4 por campo a 20X), se removió el sobrenadante y se almacenó a -80 °C hasta su uso. Este procedimiento se repitió para cada pase en dosis crecientes del compuesto como se muestra en la tabla IV. Se realizaron 2 o 3 pases para

cada concentración (2X o 3X). En el caso de la ribavirina se agregó el compuesto después de la infección.

Tabla IV

Inducción de mutantes virales resistentes al fucoidán y a la ribavirina

Fucoidán		Ribavirina	
50 µg/ml	2X	500 µg/ml	2X
100 µg/ml	3X	1000 µg/ml	3X
200 µg/ml	3X	1500 µg/ml	3X
400 µg/ml	3X	2000 µg/ml	3X
600 µg/ml	3X	2500 µg/ml	3X
800 µg/ml	3X	3000 µg/ml	3X
1000 µg/ml	3X	4000 µg/ml	3X
1200 µg/ml	3X	5000 µg/ml	3X

6.4.13 Aislamiento Independiente de Virus Mutantes Resistentes

Las UFP obtenidas en la inducción de mutantes de NDV resistentes al fucoidán de *Cladosiphon okamuranus* durante el pase 23 (1200 µg/ml) fueron examinadas bajo el microscopio invertido. Para el aislamiento de las clonas, el agar fue removido cuidadosamente y la UFP fue aislada mediante una pipeta de punta larga de 1 ml y transferida a 1 ml de medio DMEM sin suero y almacenada a -80°C o transferida nuevamente a placas de 6 pozos con células VERO. Se obtuvieron 5 clonas mutantes resistentes al efecto del fucoidán, mientras que para las clonas Wild-type (aisladas en el pase 23 sin la presencia del fucoidán de *C. okamuranus*) se obtuvieron 4 clonas.

6.4.14 Amplificación de las Secuencias HN y F del NDV

A las clonas obtenidas de la inducción de resistencia de NDV al fucoidán se les realizó extracción de RNA con la finalidad de amplificar las regiones codificantes para las proteínas HN y F del virus. Este procedimiento se realizó en placas de 6 pozos, se agregó 0.5 ml de trizol por pozo y el lisado celular se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml. y se incubó 5 min. a T.A. Se añadieron 100 µl de cloroformo y se mezclaron por inversión 15 segundos. Se incubaron en hielo de 2 a 3 min. y se centrifugó a 13000 rpm. durante 15 min. a 4° C. Se recuperó la fase acuosa y se adicionaron 250 µl de isopropanol e incubaron a -70°C por 15 minutos. Después se centrifugó a 13000 rpm. durante 10 minutos a 4 °C, se removió el sobrenadante y se lavó la pastilla con 250µl de etanol al 70%. Se mezclaron y centrifugaron por 5 min. a 4 °C. Se secó la pastilla por 5 minutos se resuspendió en agua DEPC y se cuantificó el RNA obtenido.

Se utilizó el kit de Applied Biosystem High-Capacity cDNA Archive Kit para las transcripciones reversas del RNA (de las clonas obtenidas en la inducción de resistencia de NDV al fucoidán). Se preparó una mezcla con 2µl del Buffer RT 10X, 0.8 µl de dNTP's Mix (100 mM), 2 µl de Random Primers 10 X, 1 µl de MultiScribe RT 50U/µl y 4.2 µl de H₂O. Además se realizó una dilución 1:10 del RNA extraído. Se mezclaron los 10 µl del mix y 10 µl de la dilución para dar un volumen total de 20 µl. Se incubó a 25 °C por 10 minutos seguido de un periodo de incubación de 2 horas a 37 °C. El cDNA obtenido se cuantificó y se almacenó a -70 °C hasta su uso.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó utilizando oligonucleótidos dirigidos a diferentes segmentos codificantes para las proteínas HN y F del NDV y como control endógeno se utilizaron oligonucleótidos específicos para β-actina. El diseño de los oligonucleótidos fue realizado con la colaboración del M.C. Santiago Saavedra por medio del programa AmplifX 1.6.0 beta 1 y BLAST (figura 8, tabla V).

Los reactivos utilizados para la PCR fueron: 2.5µL del Buffer 10X, 0.5 µL de dNTPs (10 mM), 0.25 µL Taq DNA Polimerasa de Alta Fidelidad (Platinum Taq DNA Polimerase, Invitrogen (5U/µl), 0.7 µL MgCl₂ (25mM), 2 µL Primer F (25 pmol), 5 µL Primer R, 5 µL de cDNA (500 ng) y se aforó a 25 µL con agua DEPC (por muestra). Los productos de las reacciones fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% conteniendo 0.5 mg/ml de bromuro de etidio.

Las condiciones de PCR fueron de 94 °C por 60 segundos seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, la temperatura de alineamiento fue establecida de acuerdo al juego de primers (tabla III) durante 30 segundos y 68 °C por 1 minuto, finalmente a 72°C por 10 minutos (Ver figura 8).

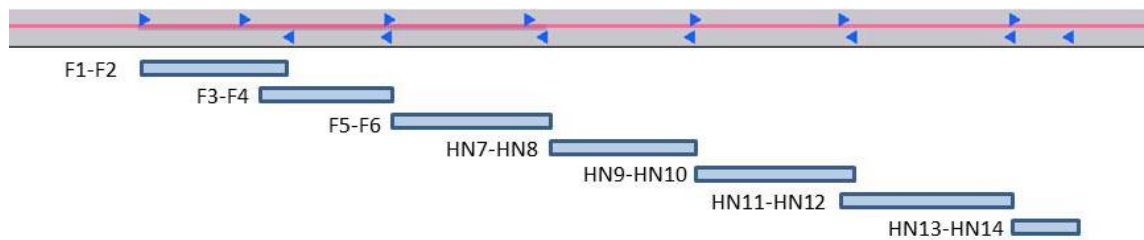


Figura 8. Representación gráfica de la posición de los primers para amplificar las regiones codificantes para las proteínas HN y F de NDV.

Tabla V

Oligonucleótidos utilizados en la amplificación de los fragmentos F y HN de NDV

F		Tamaño fragmento	TM
F1	5'- CATGGGCCCCAAACCTCCAC - 3'	597 pb	58°C
F2	5' - CAGTCCAATTCTCGCGCCGTATTA - 3'		
F3	5'- GGTTGCAACAGCTGCACAGATA - 3'	591 pb	56.7°C
F4	5'-TGCCTCACAACTTTCGGGACAA -3'		
F5	5 'CTCAGCACTTGTCCCGAAAGTTGT -3'	629 pb	56.3°C
F6	5'AGTAGCAYGCTAGAACCAGGCTAA -3'		
HN		Tamaño fragmento	TM
HN7	5'-CCTAACCAGCACATCTGCTTCAT -3'	662 pb	54.8°C
HN8	5'-GACTCAAGGGCCACYTYTTAT -3'		
HN9	5'-ATAARCARGTGGCCCTTGAGTC -3'	648 pb	55.3°C
HN10	5-CCGGTAATTTGCMACCCAATC -3'		
HN11	5'-TGACGGTCARTACCATGAGAAGGA -3'	680 pb	56.5°C
HN12	5'-CAGATACGGGRTTGAGCCTTGCTT -3'		
HN13	5'-AAGCAAGRCTCAAYCCGTATCTG -3'	250 pb	56.3°C
HN14	5'-GGCTGGYTGAACCTAGCCTCTT -3'		

6.4.15 Secuenciación de las Mutantes de NDV Resistentes a los Polisacáridos Sulfatados

Los productos amplificados de las regiones codificantes para las proteínas HN y F de NDV se purificaron utilizando el kit GFX PCR DNA Gel Band (GE Healthcare) y se enviaron al Instituto de Biotecnológica de la UNAM para su secuenciación. Las secuencias se analizaron utilizando los programas Bioedit Sequence Alignment Editor versión 7.1.3.0, CLC Main Workbench 6.6.2, CLUSTAL versión 2 y BLAST. El análisis a nivel de aminoácidos se realizó con los programas Translate Tool y CLUSTAL versión 2.1.

6.4.16 Análisis Estadístico

Los datos se analizaron con el programa SPSS versión 15. Todas las variables fueron realizadas por triplicado para cada experimento y repetido al menos tres veces. Los valores CC_{50} y CE_{50} fueron determinados por el análisis de regresión Probit. Se realizó un análisis de varianza de una vía seguido de un análisis de Dunnett. Valores de $*p < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto Citotóxico del Fucoídán de *Cladosiphon okamuranus* y los Extractos de *Macrocystis pirifera* y *Ulva clathrata* “*in vitro*”

Para determinar si el fucoídán de *Cladosiphon okamuranus* así como los extractos de *Ulva clathrata* y *Macrocystis pirifera* presentan efecto tóxico “*in vitro*”, se utilizaron como modelo el cultivo de células VERO así como el cultivo secundario de fibroblastos de embrión de pollo (CSFEP). En el caso de la línea celular VERO, NDV se adapta e infecta esta línea celular por lo cual es un buen modelo para trabajar con este virus. Sin embargo es importante también analizar la citotoxicidad de nuestros compuestos en CSFEP al ser NDV un virus aviar. Se realizaron tres ensayos por sextuplicado para cada uno de los compuestos y se calculó la CC_{50} por medio de regresión lineal (Probit) con el programa SPSS 10.

7.1.1 Efecto Citotóxico del Fucoídán de *C. okamuranus* y los Extractos de *Macrocystis pirifera* y *Ulva clathrata* en Cultivo Secundario de Fibroblastos de Embrión de Pollo

Para determinar la citotoxicidad de los compuestos en Cultivo Secundario de Fibroblastos de Embrión de pollo se realizaron ensayos de viabilidad celular. Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pozos con 15 000 células por pozo y se

determinó la viabilidad celular por medio de la técnica de MTT como se describe en material y métodos.

Los resultados obtenidos indican que la citotoxicidad del extracto proveniente de *U. clathrata* fue la más baja comparada con el fucoidán de *C. okamuranus* y con el extracto de *M. pyrifera*, obteniendo incluso un incremento en la proliferación celular a dosis de 0.1 a 100 µg/ml del extracto (figura 9).

En el caso del extracto de *M. pyrifera*, la citotoxicidad observada fue mayor con respecto al fucoidán de *C. okamuranus* y al extracto de *U. clathrata*, obteniendo una toxicidad del 60 % en la concentración de 100 µg/ml (figura 9).

Se obtuvo una CC_{50} de 973 µg/ml con el fucoidán de *C. okamuranus*, $CC_{50} >1500$ µg/ml con el extracto de *U. clathrata* (ulván) y CC_{50} 8.8 µg/ml con el extracto de *M. pyrifera* (fucoidán).

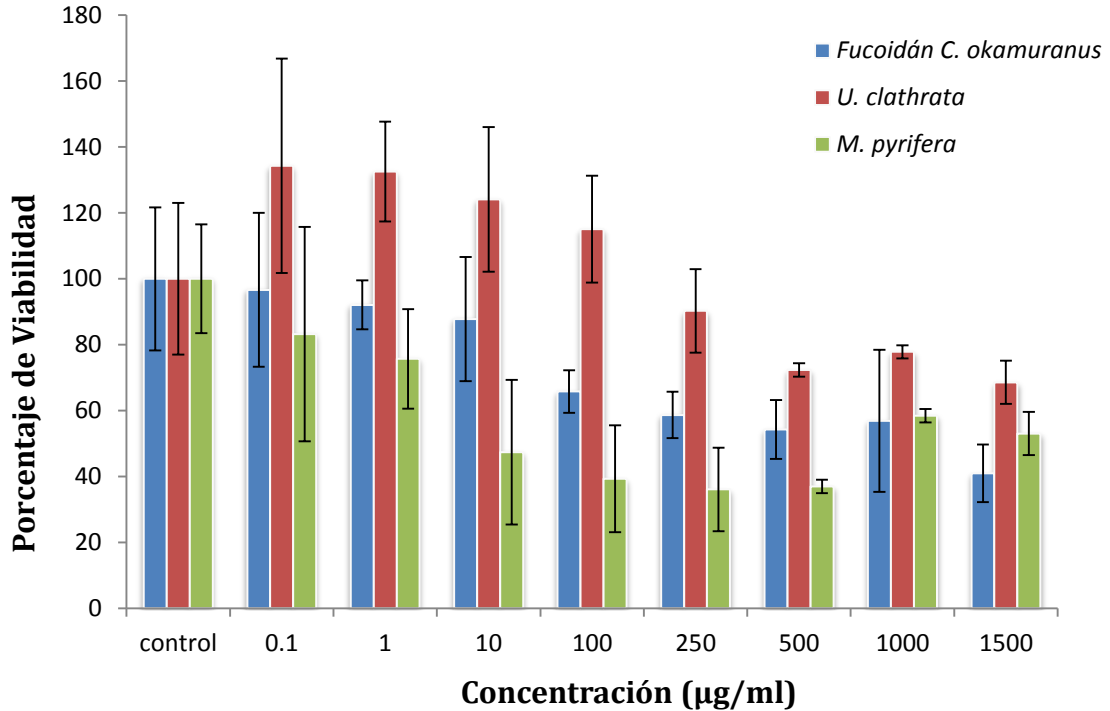


Figura 9. Efecto del fucoidán de *C. okamuranus* y los extractos de *U. clathrata* y *M. pyrifera* sobre la viabilidad del CSFEP. Las columnas de la izquierda muestran la absorbancia de células Vero sin tratar y tomadas como 100 % de viabilidad (control), seguidas de las células tratadas con concentraciones de 0.1 a 1500 µg/ml de los compuestos.

7.1.2 Efecto Citotóxico del Fucoidán de *C. okamuranus* y los Extractos, en la Línea Celular VERO

Para determinar la citotoxicidad de los compuestos en la línea celular VERO se realizaron ensayos de viabilidad celular. Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pozos con 15 000 células por pozo y se determinó la viabilidad celular por medio de la técnica colorimétrica MTT como se describe en material y métodos.

Se obtuvo una citotoxicidad muy baja tanto para el fucoidán de *C. okamuranus* como para los extractos de *U. clathrata* y *M. pyrifera* aún a concentraciones altas (< 250

µg/ml) en la línea celular VERO. Se obtuvo una $CC_{50} > 1500$ µg/ml con el fucoidán de *C. okamuranus*, con el extracto de *U. clathrata* fue de 1018.8 µg/ml, con el extracto de *M. pyrifera* no se observó un efecto citotóxico en las células, por el contrario se observa un incremento en la proliferación celular con las concentraciones probadas (0.1-1500 µg/ml). La citotoxicidad obtenida con la ribavirina (antiviral de uso comercial) en esta línea celular fue mayor CC_{50} 386 µg/ml (figura 10).

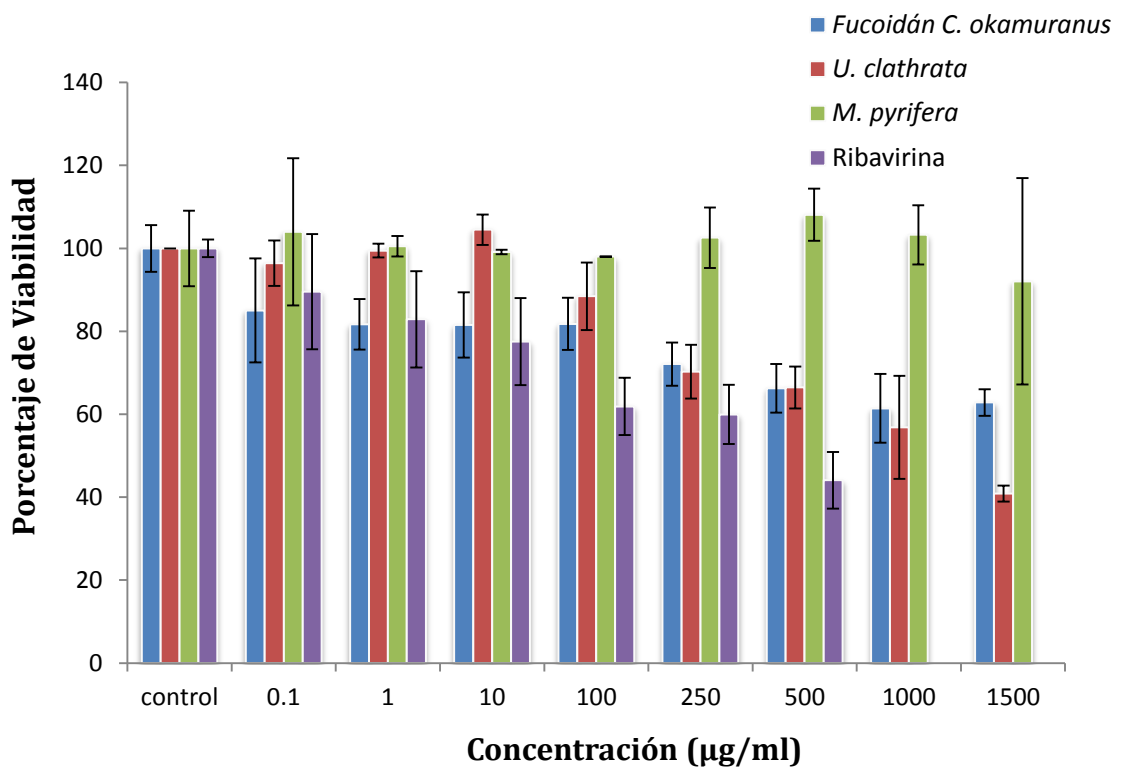


Figura 10. Efecto del fucoidán de *C. okamuranus*, los extractos de *U. clathrata* y *M. pyrifera* y el antiviral de uso comercial Ribavirina sobre la viabilidad en la línea celular VERO. Las columnas de la izquierda muestran la absorbancia de células Vero sin tratar y tomadas como 100 % de viabilidad, seguidas de las células tratadas con concentraciones de 0.1 a 1500 µg/ml de los compuestos.

7.2 Efecto Antiviral de los Polisacáridos Sulfatados sobre el Virus de la Enfermedad de Newcastle

7.2.1 Obtención del Título del Virus Newcastle por Dosis Infecciosa en Cultivo de Tejidos al 50% (DICT₅₀)

A fin de determinar el título viral de nuestro stock de NDV, se infectaron células VERO cultivadas en placas de 96 pozos con 100 µl de diluciones seriadas del abasto viral; a las 48 hrs se realizó la técnica de hemadsorción como se describe en material y métodos. El título se determinó mediante el método de Reed and Muench, dando como resultado un título del abasto viral de NDV en $10^{6.84}$ DICT₅₀/ml.

7.2.2 Obtención del Título del Virus Newcastle por Unidades Formadoras de Placas (UFP)

Para el desarrollo de la titulación de NDV (cepa silvestre) por medio de unidades formadoras de placa, se utilizó la técnica descrita por McGinnes *et al.*, 2006. El título viral obtenido fue de 1.85×10^7 UFP /ml.

7.2.3 Evaluación del Efecto de los Polisacáridos Sulfatados sobre la Formación de Sincicios Producidos por NDV

El virus de la Enfermedad de Newcastle tiene la capacidad de diseminarse en forma intercelular por fusión de las células infectadas con células no infectadas por medio de su glicoproteína de fusión “F” originando células gigantes multinucleadas o sincicios,

las cuales son apreciables en tejidos y cultivos celulares. Esto hace posible el análisis de inhibición de sincicios a fin de determinar la actividad antiviral presente en algunos compuestos.

Los ensayos se realizaron en placas de 12 pozos, las cuales se trataron con diferentes dosis del compuesto y se infectaron con NDV. Se analizó la inhibición de la formación de sincicios como se indica en material y métodos. La cantidad y el tamaño de los sincicios formados en las células infectadas con NDV se redujeron al ser tratadas con fucoidán de *C. okamuranus*, así mismo con los extractos de *U. clathrata* y *M. pyrifera* de una manera dosis dependiente como se observa en la figura 11.

Se disminuyó en un 42, 24 y 14 % el número de sincicios con respecto al control viral cuando se aplicó 0.1 µg/ml de fucoidán de *C. okamuranus*, extracto de *U. clathrata* y *M. pyrifera* respectivamente. Con 100 µg/ml la inhibición fue de 71, 75 y 67 % para el fucoidán, extracto de *U. clathrata* o *M. pyrifera* respectivamente. Se obtuvo una CE₅₀ de 0.75 µg/ml con el fucoidán de *C. okamuranus*, con el extracto de *U. clathrata* CE₅₀ de 4.78 µg/ml, con *M. pyrifera* la CE₅₀ fue de 12.71 µg/ml y como control se utilizó el antiviral de uso comercial ribavirina, el cual mostró una CE₅₀ de 225 µg/ml (figura 11) (p <0.001).

El índice de selectividad (IS) nos permite evaluar el potencial de un compuesto como antiviral al relacionar la dosis citotóxica (CC₅₀) y la dosis efectiva (CE₅₀), por lo cual se calculó el IS para cada uno de los compuestos evaluados. El mayor índice de selectividad se obtuvo con el fucoidán de *Cladosiphon okamuranus*, con un IS de 2000, mientras que para los extractos de *Ulva clathrata* y *M. pyrifera* los IS fueron 212.97 y 118.01 respectivamente. La ribavirina (antiviral de uso comercial) fue el compuesto que resultó tener una menor eficiencia para inhibir NDV, al presentar un IS de 1.75. Debido a que el polisacárido sulfatado de *C. okamuranus* “fucoidán” fue el que presentó un IS más alto y que se trataba de un compuesto purificado (a diferencia de los extractos semipurificados de *U. clathrata* y *M. pyrifera*); se decidió seleccionar este polisacárido sulfatado para determinar del mecanismo de acción de actividad antiviral.

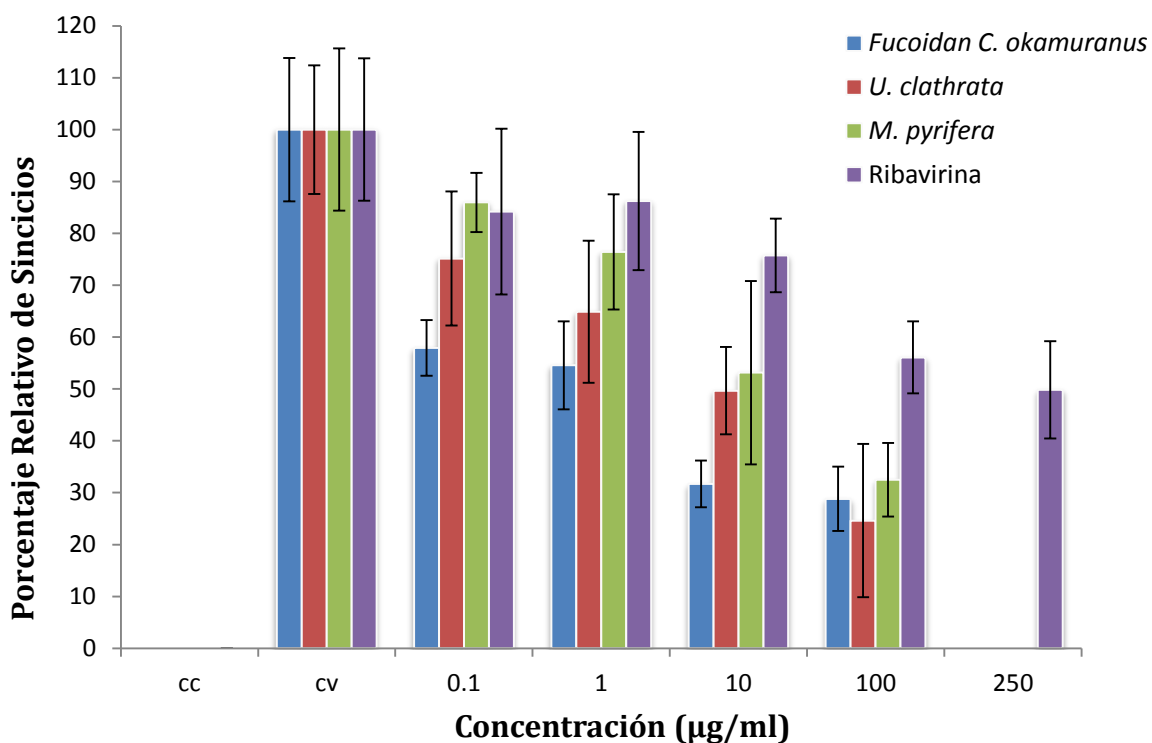


Figura 11. Efecto del fucoidán de *C. okamuranus*, del extracto de *U. clathrata*, del extracto de *M. pyrifer* y de la Ribavirina sobre la formación de sincicios por NDV. Las columnas de la izquierda muestra el porcentaje de sincitios en células Vero sin tratar y sin infectar (control celular), seguida de células Vero infectadas con NDV y sin tratamiento (Control viral), las cuales fueron tomadas como 100% de porcentaje relativo de sincicios, continuando con las células infectadas y tratadas con 0.1, 1, 10, 100 y 250 µg/ml de los compuestos.

7.2.4 Evaluación del Efecto de los Polisacáridos Sulfatados sobre la Infección de NDV por UFP

El Virus de la Enfermedad de Newcastle puede ser agregado a un medio de cultivo celular en una fase semisólida como el agar, de esta manera cuando un virus infecta una célula, los nuevos virus formados solo pueden infectar a las células inmediatamente vecinas y no a las alejadas, ya que el medio semisólido limita su movilidad. Coloreando las células se observarán zonas no teñidas (placas de lisis), correspondientes a las células

destruidas, estas placas de lisis contienen los nuevos viriones que se produjeron. En teoría cada placa de lisis formada corresponde a un único virus de la suspensión inicial en consecuencia las concentraciones virales medidas por la cantidad de placas se denominan unidades formadoras de placas.

De esta manera, se utilizó la medición de Unidades Formadoras de Placas para determinar la actividad antiviral contra NDV presente en el fucoidán de *Cladosiphon okamuranus* como se menciona en material y métodos. Se obtuvo una CE_{50} de 58 $\mu\text{g/ml}$ para el fucoidán de *C. okamuranus*, mientras que para la ribavirina se obtuvo una menor actividad inhibitoria con respecto al fucoidán, con una CE_{50} 490 $\mu\text{g/ml}$ (figura 12).

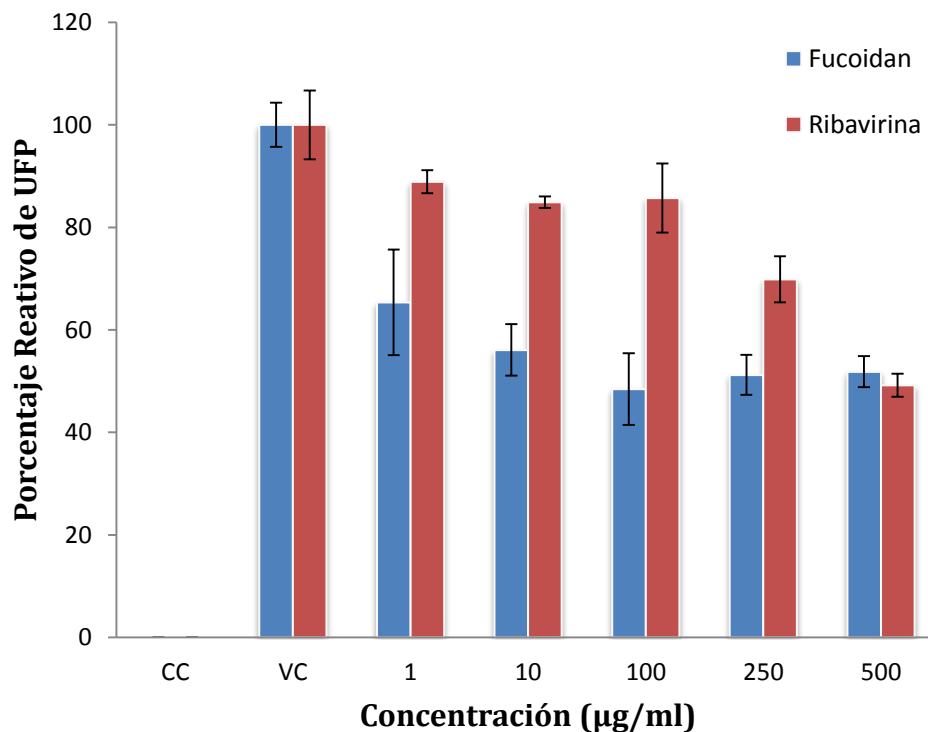


Figura 12. Efecto del fucoidán de *C. okamuranus* y la ribavirina sobre la formación de UFP por NDV. Las columnas de la izquierda muestra el porcentaje de UFP de células Vero sin tratar y sin infectar (control celular) seguida de células Vero infectadas con NDV y sin tratamiento (Control viral) las cuales fueron tomadas como 100 % de porcentaje relativo de UFP, continuando con las células infectadas y tratadas con 0.1, 1, 10, 100, 250 y 500 $\mu\text{g/ml}$ de los compuestos.

7.2.5 Inhibición de Sincicios y UFP a Producidos por NDV a Diferentes Horas de la Infección

Para determinar la etapa del ciclo viral en la cual el fucoidán de *C. okamuranus* actuaba contra NDV, se realizaron ensayos de tiempo de adición y se analizó la inhibición de sincicios y UFP en la línea celular VERO. En los ensayos de inhibición de sincicios, se infectaron placas de células VERO con 880 DICT₅₀ de NDV por pozo, se trataron con fucoidán a diferentes horas de la infección (1 µg/ml) y se analizó la inhibición de formación de sincicios. El porcentaje de sincicios formados se redujo en un 49% al ser tratadas con 1 µg/ml del fucoidán de *C. okamuranus* a la hora -1 de la infección por NDV. Al ser tratadas las células con el compuesto al mismo tiempo que la infección (Hora 0) se obtuvo la mayor reducción, con una inhibición del 61 %. Cuando se adicionó el compuesto a las horas 2, 3 y 4 después de la infección se obtuvo el menos porcentaje de inhibición (28-30 %) (Figura 13), por lo que aparentemente, el fucoidán de *C. okamuranus* está actuando en las primeras etapas del ciclo viral. Se realizaron tres ensayos por triplicado.

En los ensayos de inhibición de UFP se infectaron células VERO con 100 UFP de NDV por pozo durante 1 hora a 37 °C, se adicionó 1 µg/ml el fucoidán de *C. okamuranus* a diferentes horas de la infección y después de 72 horas se analizó la inhibición de UFP. El porcentaje relativo de UFP se redujo en un 38% con respecto al control viral, al aplicar simultáneamente el compuesto y el virus (Hora 0). En las horas 1, 2, 3, 5 y 7 post-infección no se obtuvo una inhibición mayor al 10 %. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el análisis de inhibición de sincicios a diferentes tiempos de infección, al obtener la mayor inhibición al agregar simultáneamente el compuesto y el virus, por lo cual el compuesto esta inhibiendo en la etapa inicial de la infección (figura 14).

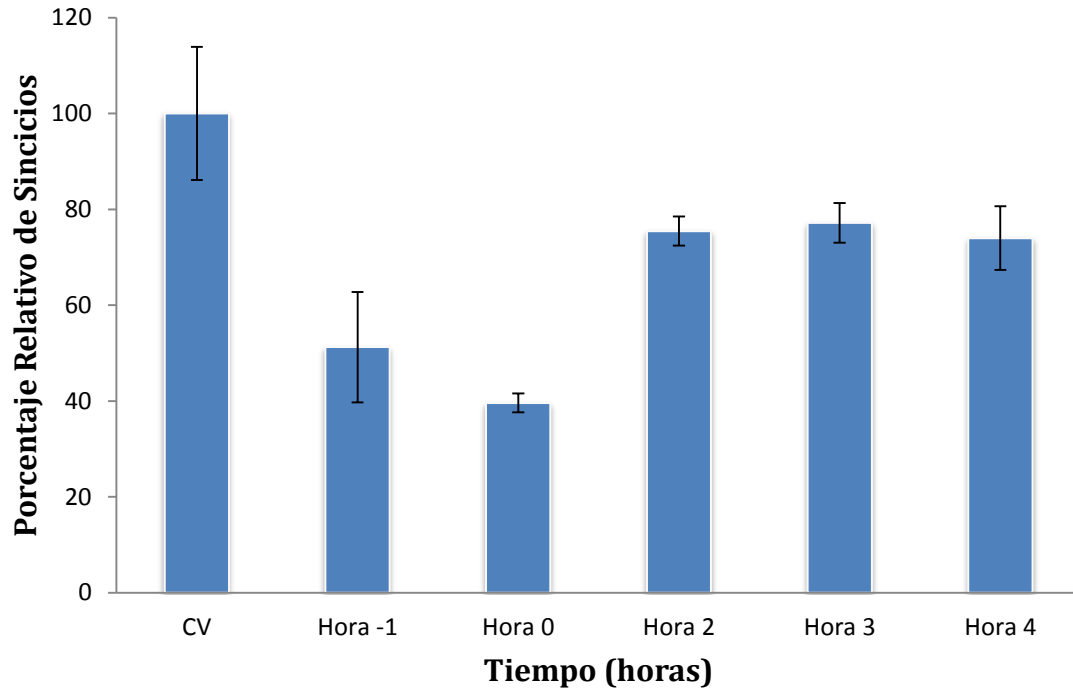


Figura 13. Efecto del fucoidán de *C. okamuranus* a diferentes horas de la infección sobre la formación relativa de sincicios. La columna de la izquierda muestra el porcentaje relativo de sincicios de células Vero infectadas con NDV y sin fucoidán seguida por las células infectadas y con el compuesto aplicado a la hora -1, 0, 2, 3 o 4. Los resultados se muestran como porcentaje relativo de sincicios considerando el control viral sin tratamiento como 100% de porcentaje relativo de sincicios.

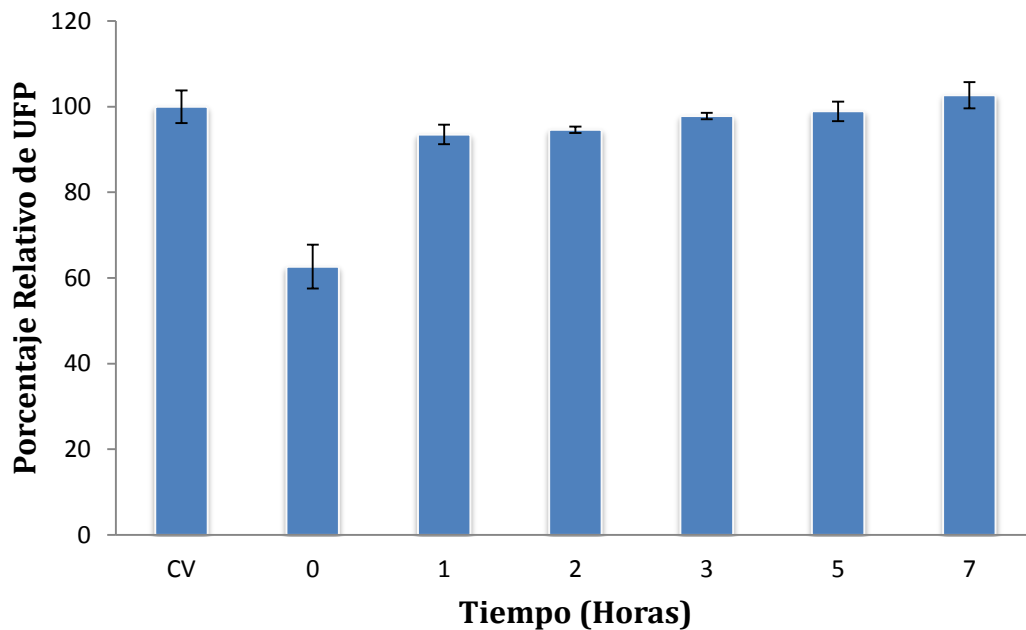


Figura 14. Efecto del fucoidán de *C. okamuranus* a diferentes tiempos de la infección sobre la formación relativa de UFP. La columna de la izquierda muestra el porcentaje de UFP en células Vero infectadas con NDV y sin fucoidán seguida por células infectadas y con el compuesto aplicado a la hora 0, 1, 2, 3, 5 o 7. Los resultados se muestran como porcentaje relativo de UFP considerando el control viral sin tratamiento como 100% de porcentaje relativo de UFP.

7.2.6 Efecto del Fucoidán en la Primera Hora de la Infección (Adsorción y Entrada)

7.2.6.1 Inhibición de Sincicios y UFP

Debido a que en los ensayos previos de inhibición a diferentes horas de la infección se observó una inhibición durante la hora cero, y no se obtuvo una inhibición significativa al agregar el fucoidán 1 hora post-infección, se realizaron ensayos orientados a determinar el paso específico en el cual el fucoidán actúa como antiviral. Se realizaron análisis de inhibición de sincicios y de UFP en la etapa de entrada del virus (en el transcurso de la primera hora). Las células VERO fueron tratadas con 1 µg/ml del

fucoidán de *C. okamuranus* a los minutos 0, 1, 2, 5, 15, 20, 30 o 60 post-infección. Se realizaron tres ensayos por triplicado para cada una de las condiciones.

El porcentaje de sincicios formados en las células infectadas con NDV se redujo en un 46 % con respecto al control viral al ser tratadas con 1 µg/ml del fucoidán de *C. okamuranus* al minuto 0, y este efecto inhibitorio se prolongó hasta el minuto 20. Por el contrario, para el minuto 30, solo se obtuvo una reducción del porcentaje relativo de sincicios del 11 %, y de un 4 % para el minuto 60 (figura 15). Se realizaron tres ensayos por triplicado.

En cuanto al porcentaje relativo de UFP en la línea celular la máxima inhibición se obtuvo en los minutos 0, 15 y 30, con una inhibición del 38, 36 y 34 % respectivamente. La inhibición más baja se obtuvo al aplicar el fucoidán 60 minutos después de la infección, al inhibir solamente un 7 % (figura 16).

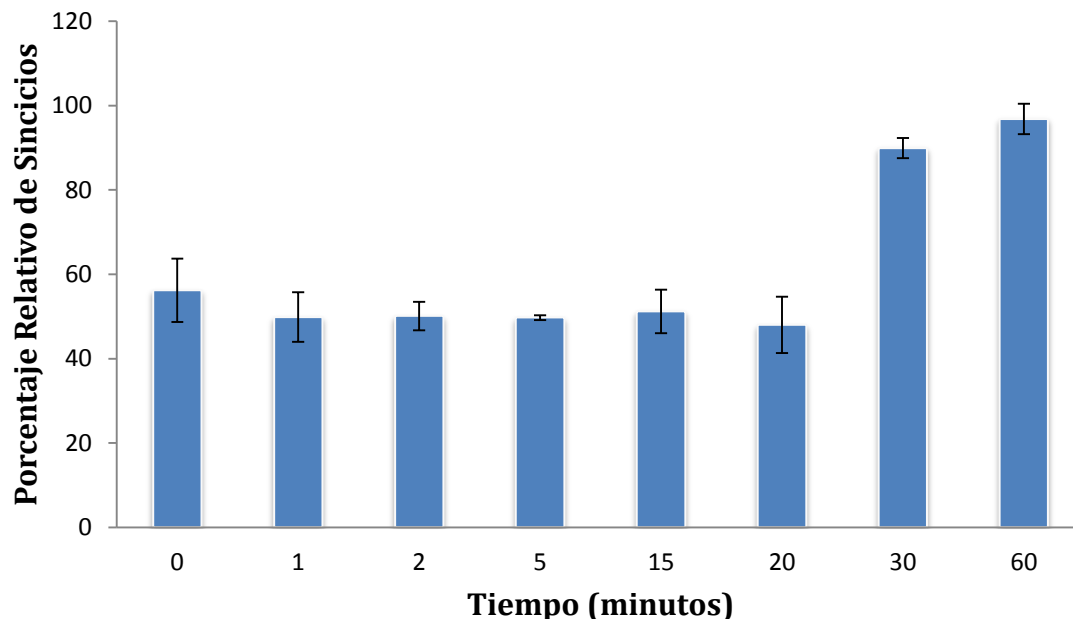


Figura 15. Inhibición de sincicios producidos por NDV, por efecto del fucoidán de *C. okamuranus* en los primeros pasos de la infección. La columna de la izquierda muestra el porcentaje relativo de sincicios en células Vero infectadas con NDV y tratadas con fucoidán al tiempo 0 de la infección, seguida de los tratamientos aplicados al minuto 1, 2, 5, 15, 20, 30 y 60 post infección. Los resultados se muestran como

porcentaje relativo de sincicios considerando el control viral sin tratamiento como 100% de porcentaje relativo de sincicios.

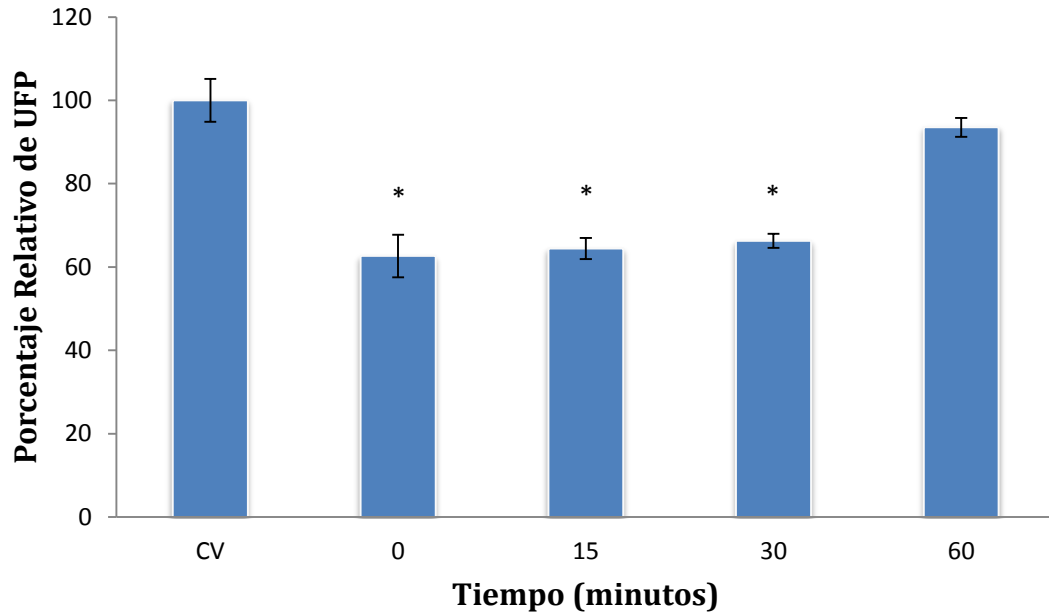


Figura 16. Efecto del fucoidán de *C. okamuranus* en la primera etapa de la infección medido por la formación relativa de UFP. La columna de la izquierda muestra el porcentaje de UFP de células Vero infectadas con NDV y sin fucoidán seguida por las columnas que muestran el porcentaje de UFP con los tratamientos con el compuesto aplicado al minuto 0, 15, 30 o 60 post-infección. Los resultados se muestran como porcentaje relativo de UFP considerando el control viral sin tratamiento como 100% de porcentaje relativo de UFP.

7.2.6.2 Efecto del Fucoidán en la Síntesis de la Proteína HN de NDV

Considerando los resultados anteriores, se evaluó el efecto del fucoidán por medio de la medición de las concentraciones relativas de proteína viral sintetizadas en las células expuestas al compuesto en las diversas etapas de la infección. Se infectaron células VERO cultivadas en placas de 6 pozos con 880 DICT₅₀ de NDV y se adicionaron 100 µg de fucoidán a diferentes tiempos de la infección y después de 48 horas se analizó la proteína viral HN mediante Western blot. Los resultados obtenidos indican que los

niveles de la proteína HN se redujeron en un 64% cuando el fucoidán se añadió a las monocapa celular Vero en el momento de la infección viral; sin embargo, cuando el compuesto se añadió 15 o 30 min después de la infección, los niveles de la proteína HN se redujeron drásticamente en un 98.6 y 98.2%, respectivamente. El compuesto tuvo un efecto menor cuando se añadió 60 min después de la infección.

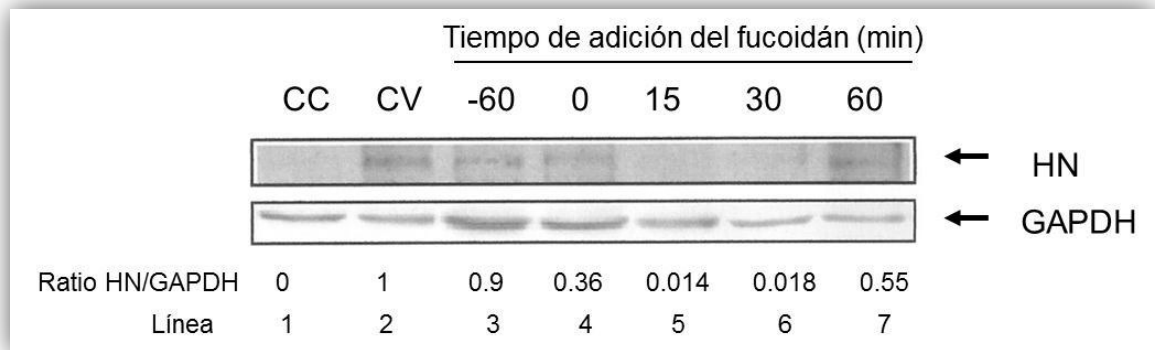


Figura 17. Niveles de la proteína HN de NDV en las células Vero infectadas con el NDV y tratadas con fucoidán. Células Vero (3×10^5) fueron infectadas con NDV y tratadas con 100 $\mu\text{g/mL}$ de fucoidán a diferentes tiempos de la infección. Carril 1, control celular sin infección de NDV (CC), Carril 2, control viral sin fucoidán (CV), carriles 3-7, células infectadas con NDV y tratados con fucoidán a los 60 min antes de la infección y 0, 15, 30, y 60 min después de la infección, respectivamente. Se prepararon los lisados celulares y cantidades iguales de los extractos proteicos (40 microgramos) se sometieron a análisis de inmunotransferencia para detectar los niveles de HN y GAPDH. La relación de la expresión HN/GAPDH en el análisis de inmunotransferencia se cuantificó utilizando el software v2003.02 Phoretix1D.

7.2.6.3 Análisis de Inhibición de NDV, en Células Infectadas y Tratadas con Fucoidán en Diferentes Tiempos de la Etapa de Entrada Viral por Inmunofluorescencia

Se analizó mediante inmunofluorescencia la inhibición viral en células Vero infectadas con NDV y tratadas con fucoidán a diferentes tiempos de la infección a fin de confirmar los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición de sincicios, UFP y Western blot. Se infectaron células VERO cultivadas en placas de 6 pozos con NDV y

se trataron con fucoidán a diferentes tiempos de la infección. Se incubaron por 24 horas y se analizaron por inmunofluorescencia como se describe en material y métodos. Los resultados indican una inhibición significativa de NDV al añadir el compuesto a los 0 y 15 minutos post-infección y un efecto antiviral débil cuando el compuesto fue añadido 1 hora antes o después de la infección (figura 18). De acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos de tiempo de adición, la mayor inhibición antiviral se obtuvo durante los primeros minutos (0-30) de la infección.

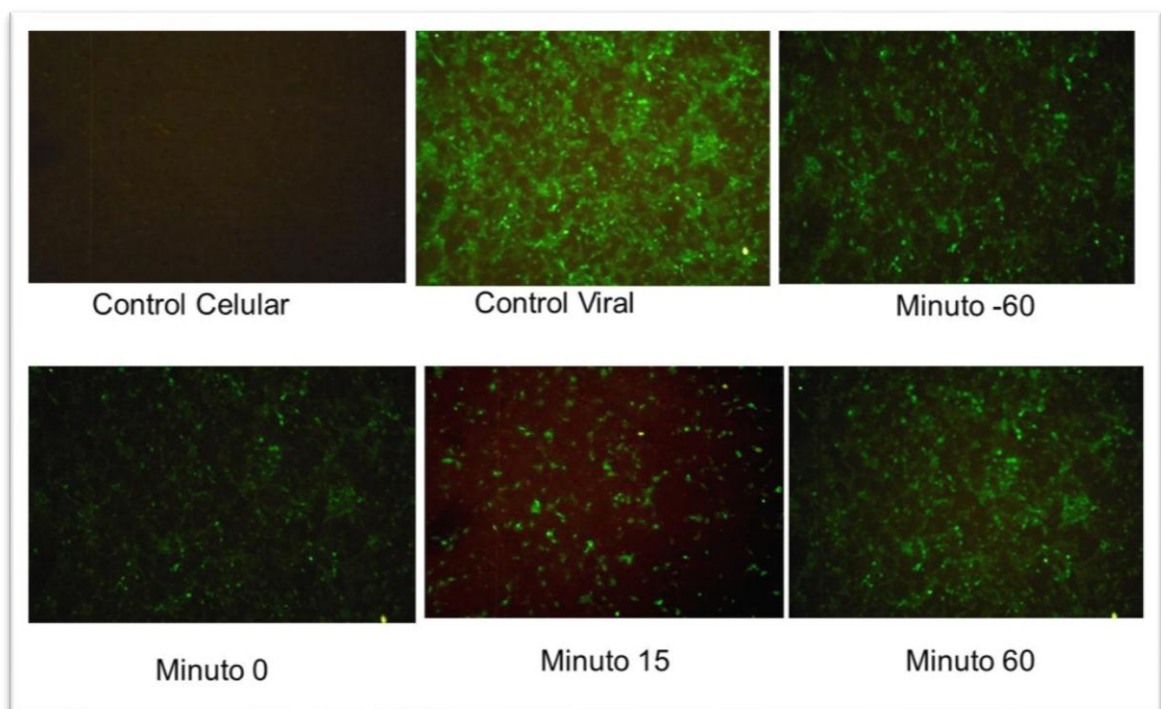


Figura 18. Efecto del fucoidán contra NDV en la primera etapa del ciclo viral. El fucoidán fue añadido a los 60 minutos antes de la infección y 0, 15 y 60 minutos post-infección con NDV, utilizando anticuerpos monoclonales anti-HN de NDV y analizado por inmunofluorescencia indirecta como se describe en material y métodos.

7.2.7 Capacidad de Fucoídán para Bloquear la Fusión Célula-célula Inducida por NDV

A fin de determinar si el fucoídán de *C. okamuranus* actúa específicamente sobre la proteína F viral, se realizaron pruebas de inhibición de la fusión celular. Las cepas avirulentas de NDV se caracterizan por su inhabilidad de formar sincicios debido a que su proteína F no puede ser cortada. Sin embargo después de la digestión con tripsina se observa la formación de sincicios. En placas de 12 pozos se infectaron células VERO con NDV vacunal y se incubaron a 37 °C durante 12 horas. Posteriormente se agregó fucoídán antes y después de ser tratadas con tripsina.

En estos ensayos, antes del corte en la proteína F, el fucoídán inhibió la formación de sincicios en un 70 % y la disminución en el número de núcleos por sincicio en un 64.8 % comparados contra el control sin fucoídán. Sin embargo, el fucoídán no inhibió la formación de sincicios al ser agregado después del corte de la proteína F por la digestión con tripsina (Figura 19 A, B). Estos resultados sugieren que el fucoídán de *C. okamuranus* inhibe la fusión viral mediante la interacción con la proteína intacta F0 pero no con la proteína madura F. Se realizaron tres ensayos por triplicado para cada condición.

A

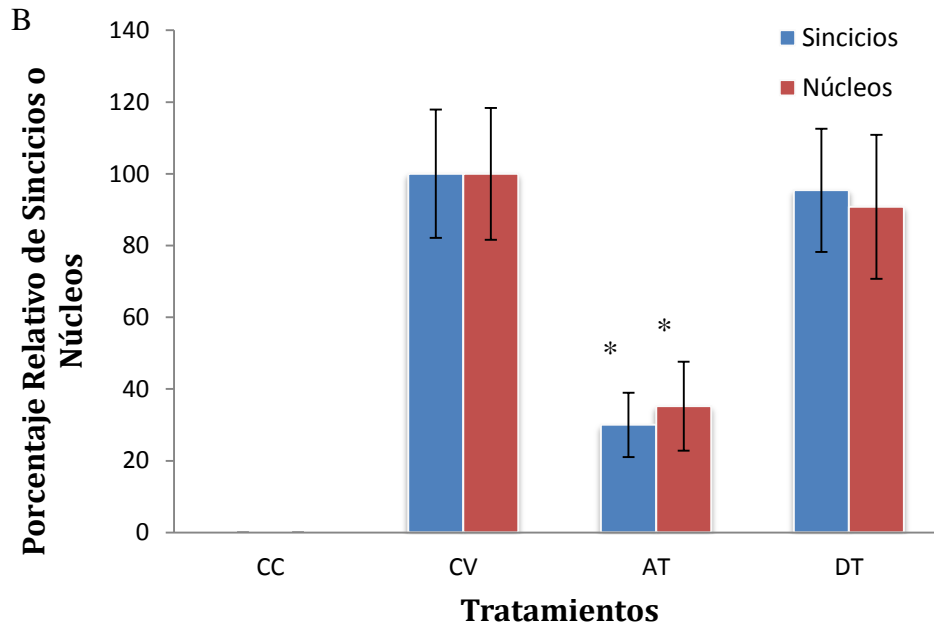
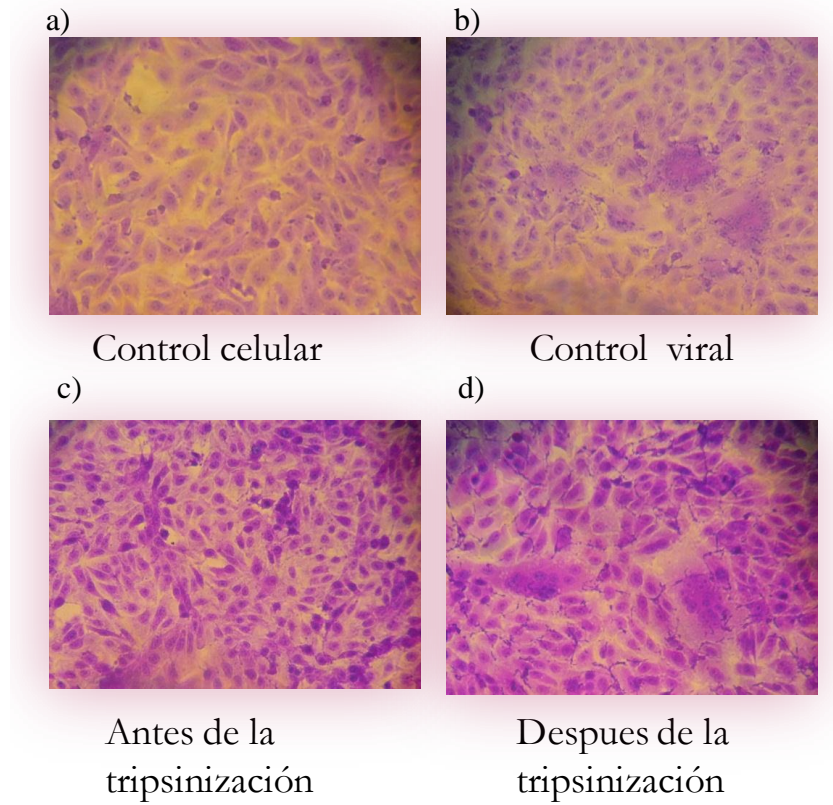


Figura 19. Inhibición de la fusión celular mediada por una cepa avirulenta de NDV (La Sota). A) la línea celular Vero fue infectada con NDV cepa la Sota y tratada con tripsina a) Control celular, sin infectar con NDV. b) Células Vero infectadas con NDV y tratadas con tripsina como Control Viral. c) Células Vero infectadas con NDV y tratadas con fucoidán antes de la adición de la tripsina d) Células Vero infectadas con NDV y tratadas con fucoidán después de la adición de la tripsina B) Ensayo de inhibición de la fusión celular con el fucoidán antes (AT) y después (DT) del corte de la proteína F. Los datos se expresan como porcentaje del número de sincicios y núcleos sincitiales en comparación con el control de células

infectadas por NDV y no tratadas (CV). Los datos mostrados son la media \pm SD de tres experimentos. Los asteriscos indican una diferencia significativa entre el tratamiento y el control viral (* $p < 0.05$).

7.2.8 Efecto del Fucoidán sobre la Penetración Viral en la Célula Hospedera

Para determinar si los eventos de entrada anteriores a la unión del virus fueron inhibidas por el fucoidán, células Vero se incubaron con NDV a 4 ° C durante 1 h para permitir la unión del virus, pero evitando la internalización del virus. El virus no unido se eliminó por lavado, se añadió medio precalentado con 0, 10, o 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de fucoidán a las células y las células se pasaron a 37 ° C para el resto del experimento. En estos experimentos, con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fucoidán se disminuyó la infección viral en un 23% y con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fucoidán se disminuyó significativamente la infección viral en un 48% en comparación con las células infectadas en ausencia de tratamiento (figura 20). Estos hallazgos apoyan la posibilidad de que los eventos posteriores a la adsorción viral son inhibidos por el fucoidán.

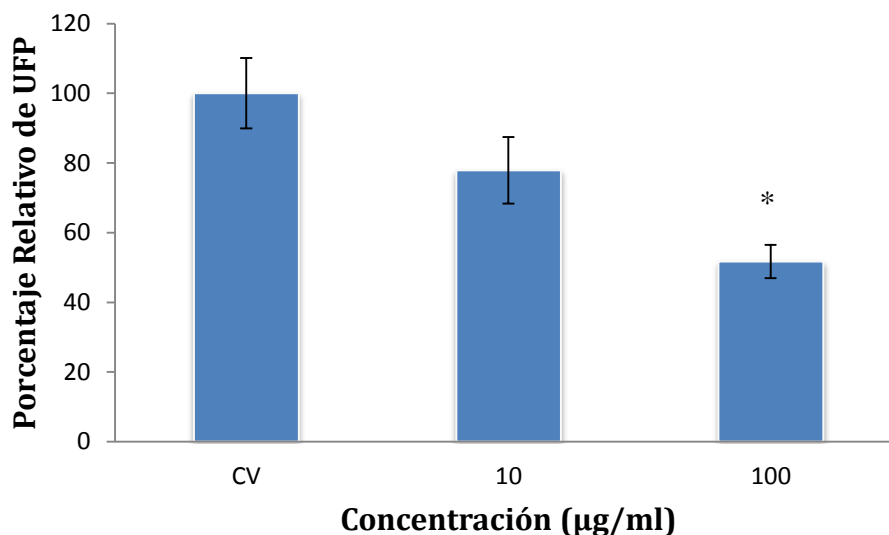


Figura 20. Efecto del fucoidán de *C. okamuranus* en la penetración viral. Células Vero se infectaron con NDV a 4 °C en ausencia de fucoidán y después se cambió la temperatura a 37 °C para permitir la penetración de los virus adsorbidos en presencia del fucoidán. El efecto del fucoidán fue evaluado utilizando ensayos de inhibición de UFP. La columna de la izquierda muestra el porcentaje relativo de UFP de células Vero infectadas con NDV y sin tratamiento (control viral). Los datos mostrados son la media \pm SD de tres experimentos. Los asteriscos indican una diferencia significativa entre el control viral y los tratamientos (* $p < 0.05$).

7.3 Efecto del Fucoidán en la Replicación de NDV *in ovo*

Embriones de pollo de 9 días fueron tratados con fucoidán y posteriormente infectados con 10 000 DICT₅₀ de NDV por 72 horas. Se realizaron extracciones de RNA a partir de intestino delgado, intestino grueso e hígado, seguido de una RT y el cDNA obtenido fue cuantificado. Se realizaron amplificaciones por PCR con primers específicos para la proteína F de NDV y para actina como gen constitutivo como se describe en materiales y métodos. Los resultados obtenidos indican de manera semicuantitativa la inhibición en los niveles de RNA viral con 4 y 16 µg por embrión (figura 21). En el caso de los embriones tratados con 4 µg, se obtuvo una inhibición del 60 %, mientras que a 16 µg se mostró una clara inhibición en los niveles de RNA viral

del 99.9 %. Estos resultados se obtuvieron al normalizar las bandas observadas para NDV y Actina obtenidas en cada uno de los ensayos.

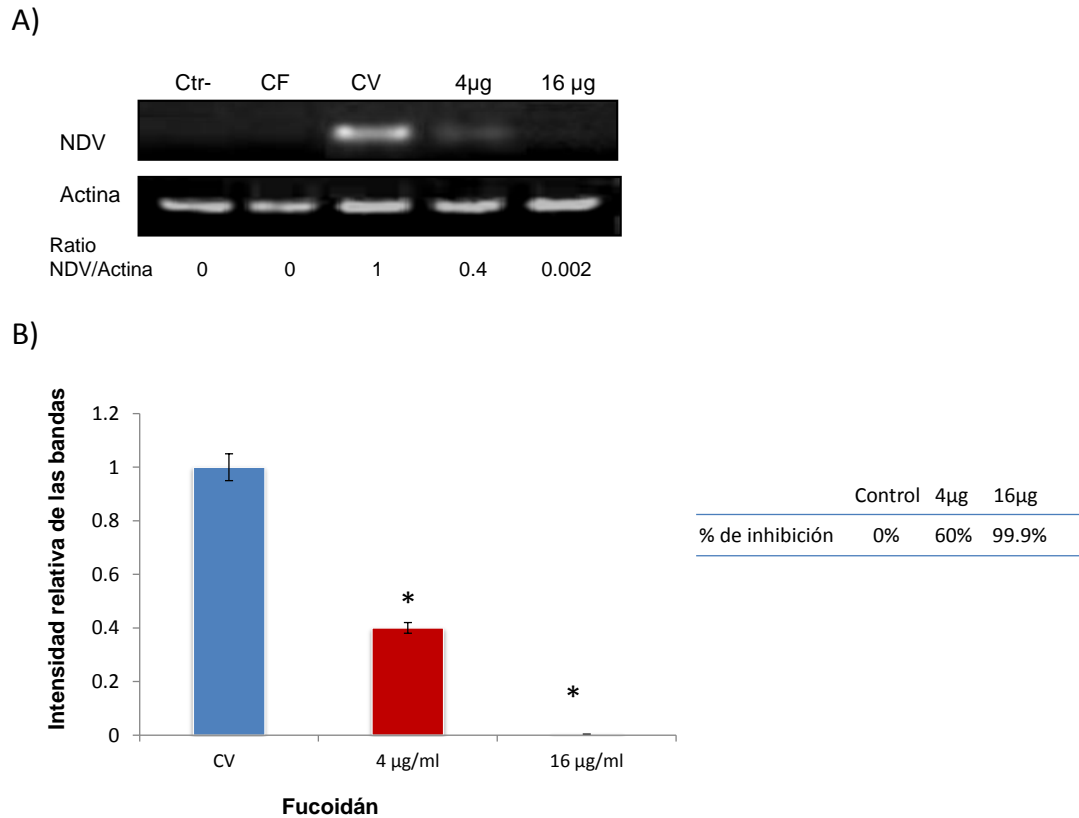


Figura 21. Efecto del fucoidán en los Niveles de RNA del virus NDV en embriones de pollo infectados. A) Embriones de pollo de 9 días fueron infectados con 10,000 DICT₅₀ de NDV y tratados con 4 y 16 µg de fucoidán por embrión. Después de 72 h se extrajo el RNA de intestino delgado, intestino grueso e hígado y se analizó por medio de RT-PCR semicuantitativo un fragmento del gen de la proteína F de NDV y en paralelo un fragmento del gen constitutivo β-actina. B) El ratio relativo de RNA de NDV/β-actina fue cuantificada utilizando el programa Phoretix 1D v2003.02. Los datos se expresan como intensidades de banda relativas al control (control infectado y sin tratamiento), el cual se define como 1.0. Los datos mostrados son la media ± SD de tres experimentos separados, cada uno realizado por triplicado (* p<0.01).

7.4 Obtención de Mutantes Virales Resistentes a los compuestos

7.4.1 Obtención de Mutantes Virales Resistentes a la Ribavirina

Con la finalidad de obtener mutantes virales resistentes a la ribavirina (antiviral de uso comercial) y posteriormente analizar su susceptibilidad al fucoidán de *C. okamuranus*, se realizaron pases de NDV en presencia de dosis crecientes (figura 22) de la ribavirina como se describe en la metodología. A fin de determinar la resistencia a la ribavirina, se analizó la susceptibilidad del sobrenadante obtenido en el pase número 23 (stock viral resistente a la ribavirina). Como se observa en la figura 22, 23, aun con dosis de 3000 $\mu\text{g/ml}$ no se alcanza la EC_{50} , por lo que es al menos 6 veces mayor a la EC_{50} obtenida con el stock viral wild-type. Con esto queda demostrado que las mutantes obtenidas realmente presentan resistencia a la ribavirina.

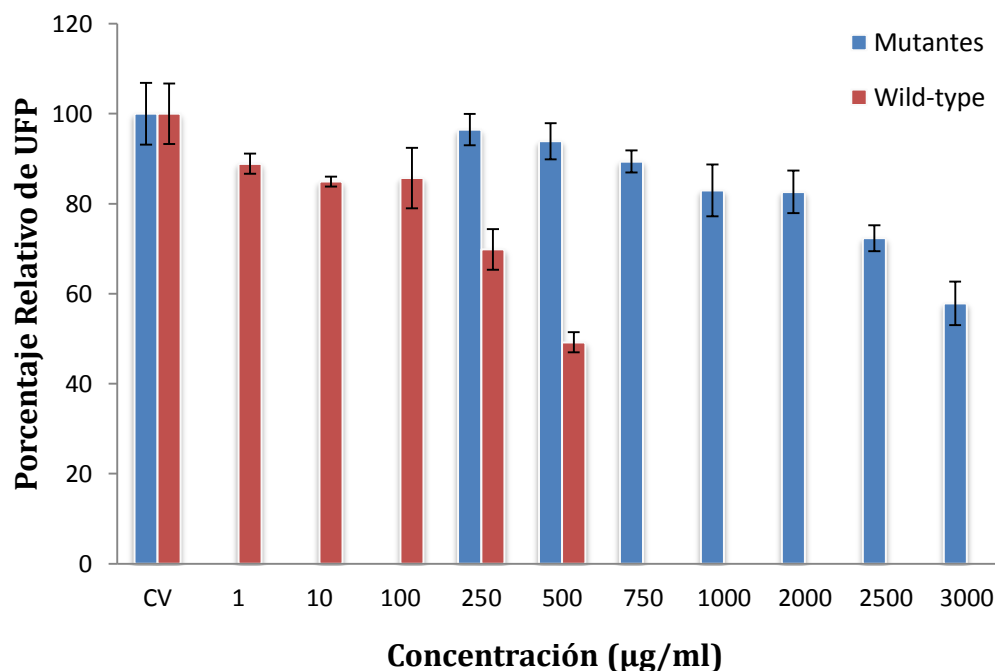


Figura 21. Comparativo de la actividad antiviral de la ribavirina con el stock viral wild-type y mutantes resistentes. Las barras en color azul representan los resultados obtenidos con el stock viral resistente a la ribavirina, mientras que las barras en color vino representan los resultados obtenidos con el stock viral wild-type. Las columnas de la izquierda muestran las células Vero infectadas y sin tratamiento, seguidas de 1, 10, 100, 250, 500, 750, 1000, 2000, 2500 y 3000 $\mu\text{g/ml}$ de ribavirina. Los resultados se muestran como porcentaje relativo de UFP considerando el control viral sin tratamiento como 100% de porcentaje relativo de UFP.

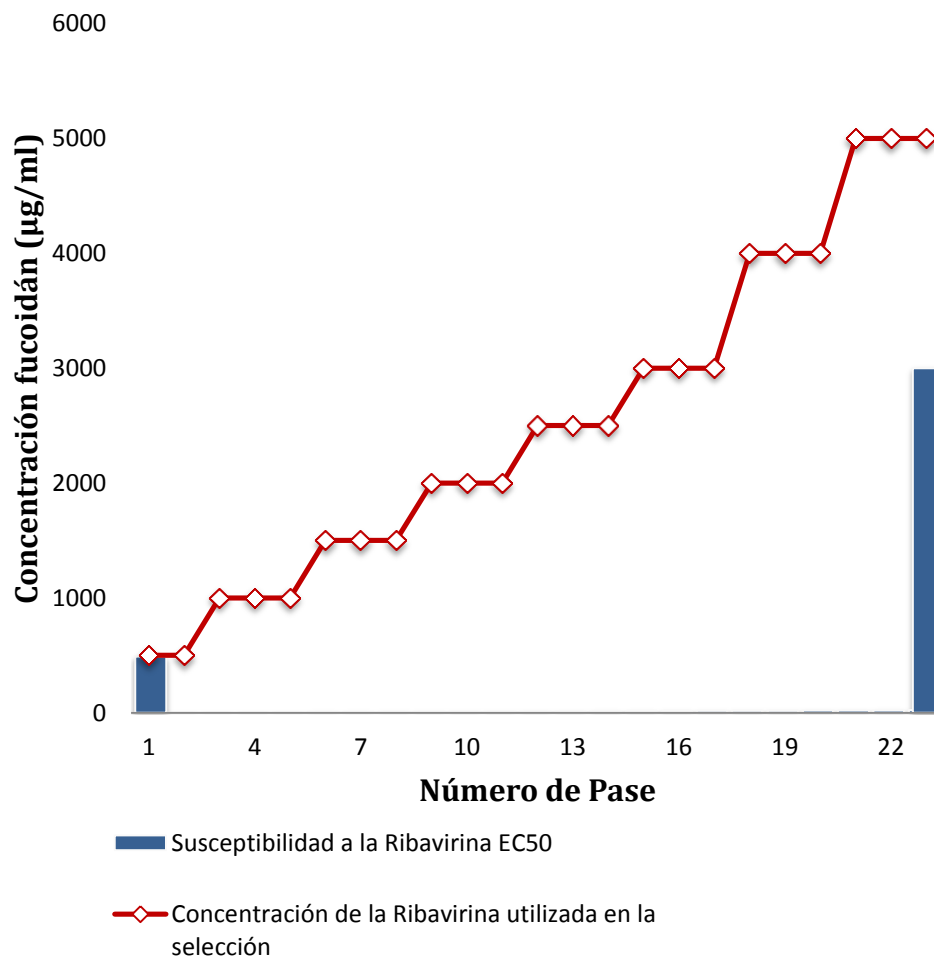


Figura 23. Concentración de Ribavirina utilizada en la selección de resistencia por parte de NDV. La línea muestra la concentración de Ribavirina utilizada en cada uno de los pases y las barras muestran la EC₅₀ del stock viral al inicio y al término de la selección de resistencia viral. En el caso del número de pase 23, no se alcanzó la EC₅₀ no fue posible realizar el análisis a dosis mayores debido a alta toxicidad de la ribavirina.

7.4.2 Susceptibilidad de las Mutantes Virales Resistentes a la Ribavirina al Fucoidán de *C. okamuranus*

Con la finalidad de determinar la susceptibilidad al fucoidán de *C. okamuranus* por parte de las mutantes virales resistentes a la ribavirina, se infectaron células VERO con el stock viral resistente a la ribavirina y se trataron con diferentes concentraciones del fucoidán de *C. okamuranus* como se indica en material y métodos. Los resultados indican una susceptibilidad comparable con el stock wild-type, obteniendo una EC_{50} de 60 $\mu\text{g/ml}$, por lo tanto no representa una diferencia significativa ($p > 0.05$) (figura 24).

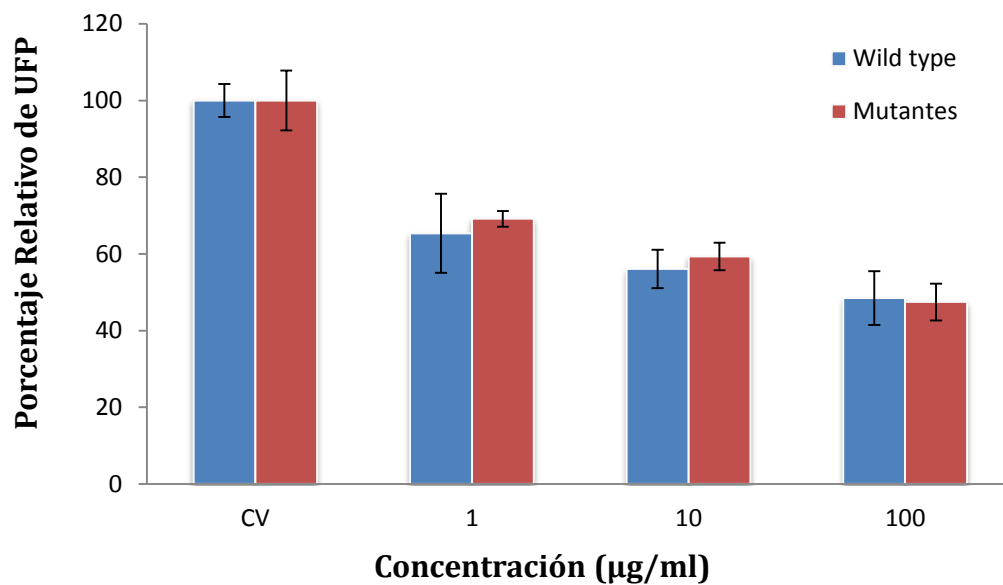


Figura 24. Comparativo de la susceptibilidad al fucoidán de *C. okamuranus* del stock viral wild-type y mutante viral resistente a la ribavirina. Las barras en color vino representan los resultados obtenidos con el stock viral resistente a la ribavirina, mientras que las barras en color azul representan los resultados obtenidos con el stock viral wild-type. Las columnas de la izquierda muestran las células Vero infectadas y sin tratamiento, seguidas de 1, 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de fucoidán de *C. okamuranus*. Los resultados se muestran como porcentaje relativo de UFP considerando el control viral sin tratamiento como 100% de porcentaje relativo de UFP.

7.4.3 Obtención de Mutantes Virales Resistentes al Fucoidán

Con la finalidad de obtener mutantes virales resistentes al fucoidán se realizaron pases de NDV en presencia de dosis crecientes del fucoidán y se analizó la susceptibilidad del sobrenadante obtenido en el pase número 23 (stock viral resistente al fucoidán). Como se observa en las figuras 25, 26, se obtuvo una EC_{50} de 289 $\mu\text{g/ml}$ con el stock viral resistente al fucoidán, por lo que es al menos 4 veces mayor a la EC_{50} obtenida con el stock viral wild-type, con lo cual queda demostrado que el stock viral obtenido presenta resistencia al fucoidán.

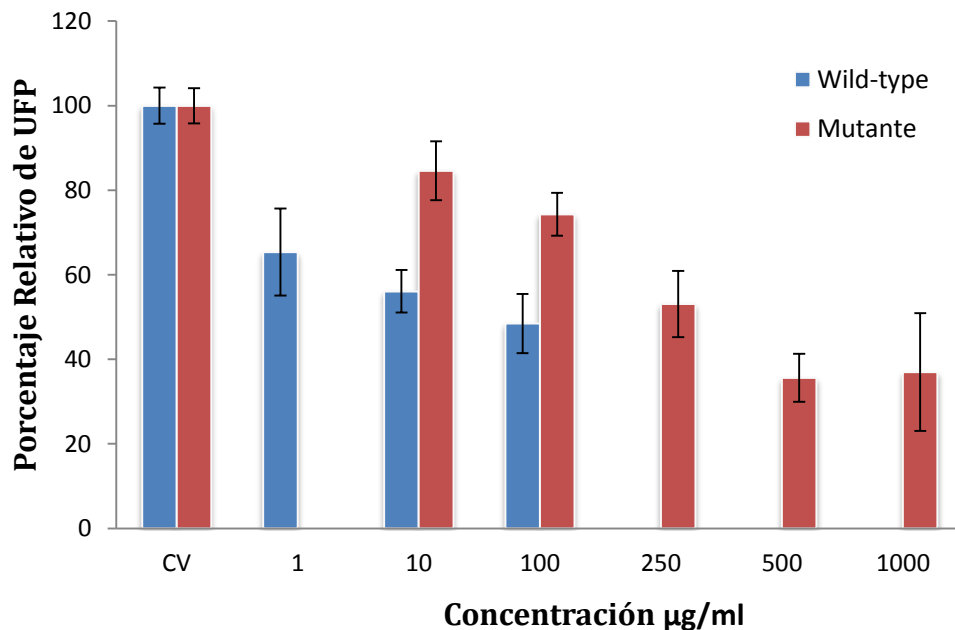


Figura 25. Comparativo de la susceptibilidad al fucoidán de *C. okamuranus* del stock viral wild-type y el stock sometido a dosis crecientes del compuesto. Las barras en color vino representan los resultados obtenidos con el stock viral resistente al fucoidán, mientras que las barras en azul representan los resultados obtenidos con el stock viral wild-type. Las columnas de la izquierda muestran las células Vero infectadas y sin tratamiento, seguidas de 1, 10, 100, 250, 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ de fucoidán de *C. okamuranus*. Los resultados se muestran como porcentaje relativo de UFP considerando el control viral sin tratamiento como 100% de porcentaje relativo de UFP.

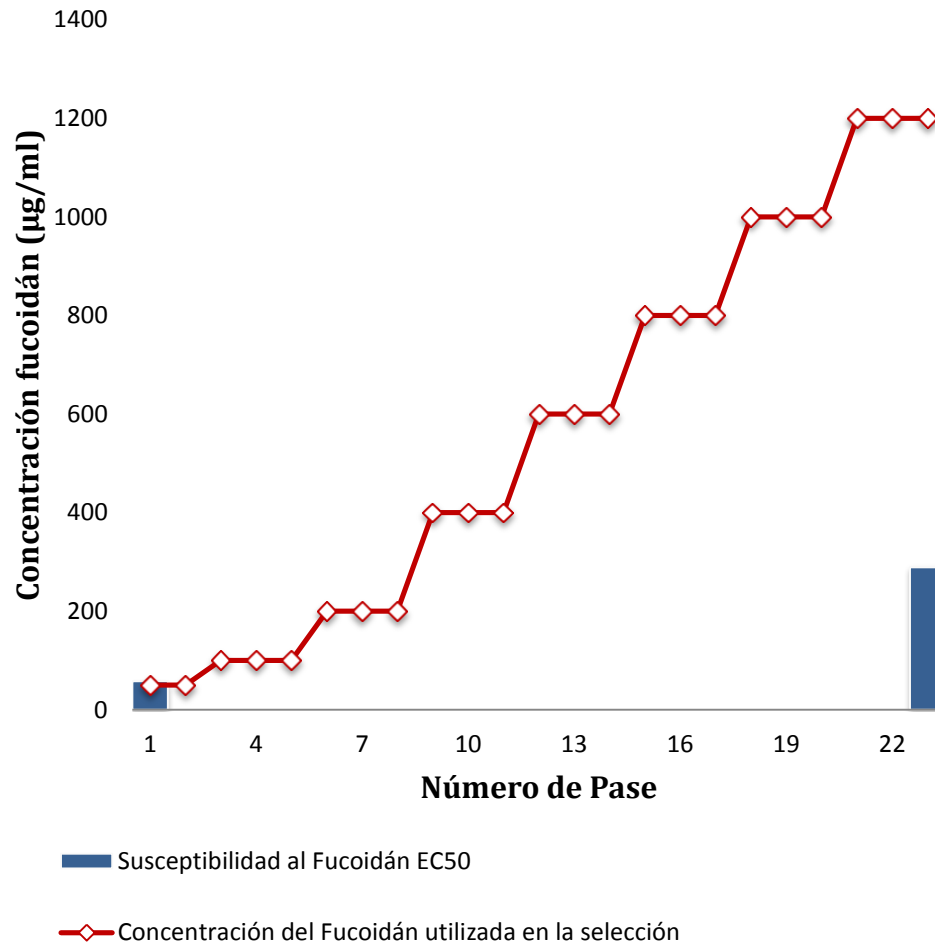


Figura 26. Concentración del fucoídán utilizado en la selección de resistencia por parte de NDV. La línea muestra la concentración de fucoídán utilizado en cada uno de los pases y las barras muestran la EC₅₀ del stock viral al inicio y al término de la selección de resistencia viral.

7.4.3.1 Secuenciación de las Mutantes Virales Resistentes al Fucoídán

Con la finalidad de determinar los cambios nucleotídicos de las clonas virales resistentes al fucoídán, se realizó un análisis de los fragmentos F y HN amplificados y secuenciados a partir de clonas de NDV wild-type y mutantes resistentes al efecto del fucoídán. Se aislaron 5 clonas virales resistentes al fucoídán a partir del stock viral resistente al fucoídán y 4 clonas wild-type, se amplificaron las secuencias codificantes para las proteínas HN y F y se secuenciaron como se describe en la metodología. Las

secuencias obtenidas fueron analizadas y comparadas utilizando los programas Bioedit Sequence Alignment Editor versión 7.1.3.0, CLC Main Workbench 6.6.2, CLUSTAL 2.1 y BLAST. Se obtuvo una secuencia consenso de las 4 clonas Wild-type utilizando los programas Bioedit Sequence Alignment Editor versión 7.1.3.0 y CLC Main Workbench 6.6.2. Los alineamientos entre las secuencias Wild-type y las mutantes resistentes al fucoidán se realizaron utilizando el programa CLUSTAL 2.1 y el BLAST. Se encontraron 16 cambios nucleotídicos comprendidos entre la posición 5528 y 5589 del genoma viral, la cual corresponde a la región que codifica para la proteína de fusión. En la región que codifica para la proteína HN, se encontraron 8 substituciones nucleotídicas (comprendidas entre las regiones 6674-7076) (Tabla VI). La secuencia wild-type no presentó diferencias nucleotídicas con respecto a la reportada en el GenBank KC844235.1 en las regiones donde se encontraron los cambios de las clonas mutantes resistentes al fucoidán.

Tabla VI

Cambios nucleotídicos de las clonas mutantes virales resistentes al fucoidán

Posición nucleótido	GenBank KC844235.1	Wildtype	Mutante 1	Mutante 2	Mutante 3	Mutante 4	Mutante 5	Proteína
5528	G	G			T	T	C	Fusión
5529	T	T	C		G	G		
5530	G	G			T	T		
5534	G	G	C		C	C		
5541	T	T			A	A		
5542	T	T	A				A	
5544	A	A			C	C		
5546	A	A			G	G		
5548	C	C			G	G		
5550	C	C			A	A		
5551	A	A			C	C		
5559	T	T			G	G		
5579	T	T			A			
5584	T	T			G	G		
5588	A	A			C	C		
5589	G	G			T	T		
6674	T	T			G			HN
6778	T	T		C				
6779	G	G				T		
6780	G	G		A				
6781	G	G		A				
6849	T	T			C			
6875	C	C			G			
7076	C	C		T				

7.4.3.2 Análisis de Aminoácidos de las Mutantes Virales Resistentes al Fucoidán

Con la finalidad de determinar los cambios en los residuos de aminoácidos de las clonas virales resistentes al fucoidán, se realizó la traducción mediante el programa en línea Translate tool de las secuencias de nucleótidos de los fragmentos F y HN amplificados y secuenciados a partir de clonas de NDV Wild-type y mutantes resistentes al efecto del fucoidán. Las secuencias fueron comparadas utilizando el programa CLUSTAL 2.1, y el BLAST. Se encontraron 9 sustituciones de residuos de

aminoácidos en la proteína de fusión (figura 27, tabla VII). En cuanto a la proteína HN se encontraron 5 substituciones de aminoácidos (figura 28, tabla VII) La secuencia wild-type no presentó diferencias en los aminoácidos con respecto a la reportada en el GenBank KC844235.1 en las regiones donde se encontraron los cambios de las clonas mutantes resistentes al fucoidán (tabla VII).

Tabla VII

Cambios en la secuencia de aminoácidos de las clonas mutantes virales resistentes al fucoidán

Posición aminoácido	GenBank KC844235.1	Wildtype	Mutante 1	Mutante 2	Mutante 3	Mutante 4	Mutante 5	Proteína
341	V	V	A		C	C	L	Fusión
343	E	E	Q		Q	Q		
345	L	L			H	H		
346	D	D			A	A		
347	T	T			A	A		
348	S	S			Y	Y		
351	I	I			R	R		
358	Y	Y			N			
359	C	C			W	W		
93	V	V			G			HN
129	W	W		R		L		
130	G	G		R				
161	A	A			G			
230	S	S		F				

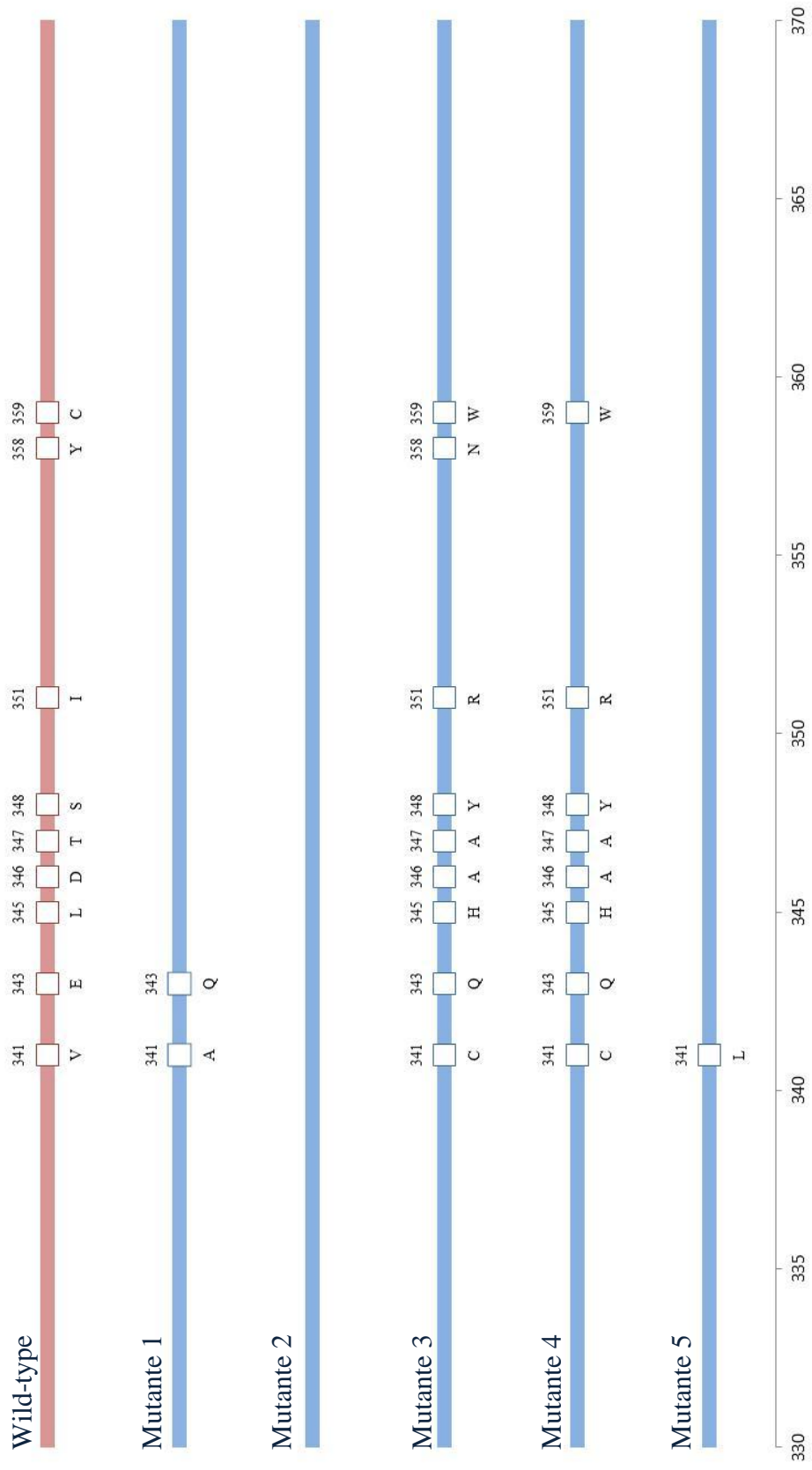


Figura 27. Representación gráfica de los cambios de residuos de aminoácidos en la proteína de fusión

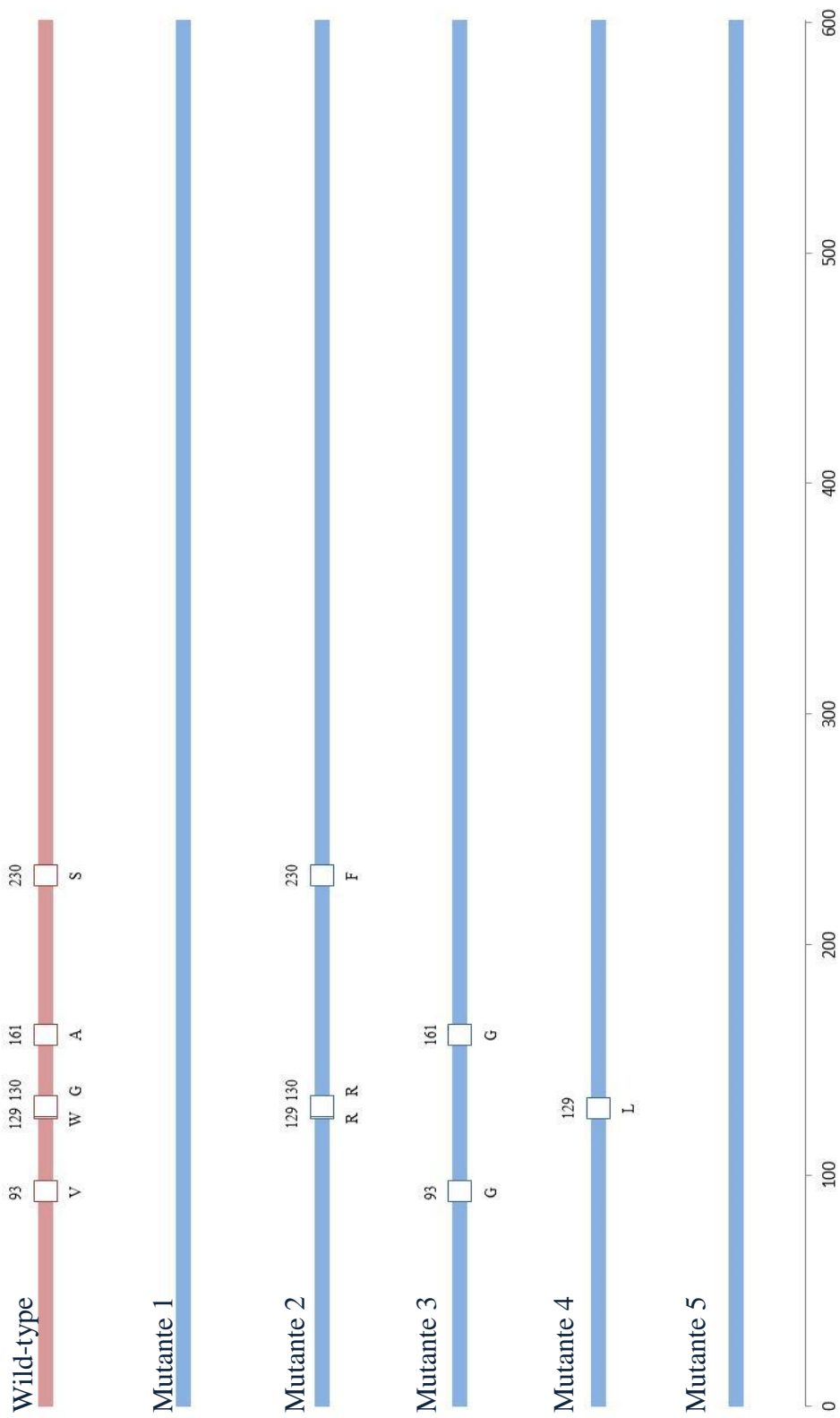


Figura 28. Representación gráfica de los cambios de residuos de aminoácidos en la proteína HN.

8. DISCUSIONES

NDV es una de las enfermedades infecciosas más graves que afectan a las aves, especialmente aves de corral, y que ha sido la causa de graves pérdidas económicas (Alexander, 2000). En la actualidad no existe tratamiento para NDV. La vacunación es una práctica generalizada y sigue siendo el método recomendado para la prevención. Aunque la vacunación es ampliamente utilizada como una práctica de manejo, cepas velogénicas son endémicas en aves de corral comercial de muchos países (Villegas, 1998; Ezema *et al.*, 2008). Esto representa un problema importante para la industria de aves de corral y por lo tanto requiere de medidas adicionales para prevenir y controlar esta enfermedad.

Los tratamientos antivirales no están disponibles en la industria avícola debido a los altos costos y a alta toxicidad, por lo tanto, una alternativa prometedora es el uso de compuestos de origen natural, los cuales han sido poco estudiados para este fin (Jassim and Naji, 2003; Yasuhara-Bell and Lu, 2010).

En los últimos años, los consumidores están volviendo a comida más natural y está claro que éste fenómeno está causando cambios en los procesos de obtención y desarrollo de alimentos. En la actualidad, muchos grupos de investigación están trabajando en compuestos de origen natural con actividad antiviral, antibacterial, antiparasitaria, antioxidante o promotora de crecimiento (Waihenya *et al.*, 2002; Damonte *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Queiroz *et al.*, 2006; Wallace *et al.*, 2010; Yasuhara-Bell and Lu 2010).

El potencial de la utilización de polisacáridos sulfatados a partir de algas en el tratamiento de enfermedades virales ha despertado un gran interés en la comunidad científica (Damonte *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Hidari *et al.*, 2008). Diversos

polisacáridos sulfatados provenientes de algas marinas han demostrado tener actividad antiviral contra una gran variedad de virus y su eficacia depende de la composición de azúcares, la longitud de la cadena principal, nivel de sulfatación y el patrón de los grupos sulfato (Witvrouw and De Clerq, 1999; Damonte *et al.*, 2004; Haneji *et al.*, 2005; Hidari *et al.*, 2008; Gosh *et al.*, 2009; Jiao *et al.*, 2011). El polisacárido sulfatado fucoidán proveniente de algas pardas ha mostrado en numerosos estudios el potencial para inhibir diferentes virus como el dengue tipo 2 (Hidari *et al.*, 2008) y HTLV (Haneji *et al.*, 2005).

Una ventaja de los polisacáridos sulfatados proveniente de algas es su alto contenido en su matriz extracelular y, en consecuencia, pueden ser preparados y puestos a disposición a muy bajo costo. Los polisacáridos sulfatados aislados a partir de muchas especies de algas marinas poseen variaciones específicas en su estructura que parecen afectar su actividad antiviral (Harden *et al.*, 2009).

Un importante efecto secundario no deseado de polisacáridos sulfatados es la actividad anticoagulante. Este efecto adverso puede evitarse mediante la selección de polisacáridos sulfatados como el fucoidán de *C. okamuranus*, el cual prácticamente carece de actividad anticoagulante (Cumashi *et al.*, 2007). Cumashi *et al* sugieren que la alta presencia de ácido glucurónico es la característica responsable de la falta de actividad anticoagulante del fucoidán de *C. okamuranus* (Cumashi *et al.*, 2007). Por el contrario, se ha propuesto que la actividad antiviral de fucoidán se relaciona con la concentración de fucosa y ácidos urónicos. Hidari *et al* encontraron que las propiedades antivirales de fucoidán de *C. okamuranus* contra el virus del dengue tipo 2 desapareció cuando el ácido glucurónico era carboxilo-reducido, adicionalmente Jiao *et al* encontraron que un derivado de fucoidán carboxilo-reducido de *C. okamuranus*, que contenía fucosa y grupos sulfato pero no ácidos urónicos, no mostraron efectos antivirales significativos contra Influenza A (Jiao *et al.*, 2011).

Existen muy pocas medicamentos disponibles para el tratamiento de las infecciones causadas por virus de RNA. La Ribavirina inhibe muchos Paramyxovirus *in vitro* como

parainfluenza, virus del sarampión, virus de las paperas, virus sincitial respiratorio y el virus del distemper canino (Snell, 2001; Elia *et al.*, 2008). La Ribavirina está aprobada para el tratamiento de infecciones por virus sincitial respiratorio en niños; sin embargo su eficacia es limitada (Ventre and Randolph, 2007). En nuestros ensayos, la Ribavirina no mostró buena actividad antiviral debido a que su EC₅₀ fue 490 y su CC₅₀ fue muy cercana a este valor dando un IS de 0.78. Por el contrario nuestros resultados en la línea celular Vero con fucoidán de *Cladosiphon okamuranus* arrojaron una CC₅₀ >1500 µg/ml, mientras que para el extracto de *U. clathrata* fue de 1019.8 µg/ml y para el extracto de *M. pyrifera* fue >1500 µg/ml. Estudios previos reportaron una baja citotoxicidad de los polisacáridos sulfatados provenientes de diferentes algas, consistente con nuestros resultados (Bouhlal *et al.*, 2011). En un estudio realizado por Guideon and Rengasamy, trataron a ratas con *C. okamuranus* y no observaron cambios en órganos así mismo no presentaron cambios en la morfología histopatológica, consistente con una baja toxicidad presentada por el polisacárido sulfatado fucoidán de *C. okamuranus* (Guideon and Rengasamy, 2008).

En el caso del cultivo secundario de embrión de pollo, los resultados obtenidos para los diferentes compuestos fueron CC₅₀ de 973 µg/ml para el fucoidán de *C. okamuranus*, >1500 µg/ml con el extracto de *U. clathrata* y 8.8 µg/ml con el extracto de *M. pyrifera*. En este caso el extracto de *M. pyrifera* resultó tener efecto tóxico a concentraciones muy bajas. Esto podría deberse a que el extracto de *M. pyrifera* presente efectos biológicos adicionales al extracto de *U. clathrata* y *C. okamuranus*, además el ensayo fue realizado con un extracto semipurificado de *M. pyrifera*, a diferencia del fucoidán purificado de *C. okamuranus*, por lo cual otros componentes podrían ser los causantes de dicha toxicidad.

Con respecto a la actividad antiviral los tres compuestos obtuvieron una inhibición en la formación de sincicios mayor al 60% a con 100 µg/ml, lo cual concuerda con otros estudios como el de Romanos *et al.*, (2002) donde evaluaron la actividad antiviral del fucoidán de *Laminaria abyssalis* contra el virus linfotrófico humano T1 (HTLV-1) en donde obtuvieron el mayor porcentaje de inhibición a una concentración de 100 µg/ml.

Debido a que la mejor actividad antiviral se obtuvo con el fucoidán de *C. okamuranus* con un IS de 2000 comparado con los extractos de *Ulva clathrata* y *M. pyrifera* con IS fueron 212.97 y 118.01 respectivamente, se decidió seleccionar el fucoidán para determinar su mecanismo de acción antiviral, con la ventaja de que este polisacárido sulfatado tenía un 99% de pureza.

En este trabajo decidimos evaluar el mecanismo de acción antiviral del fucoidán de *Cladosiphon okamuranus*, su tendencia de inducir mutantes así como la susceptibilidad a este de las mutantes resistentes a la ribavirina.

El fucoidán de *C. okamuranus* presentó una buena actividad antiviral contra NDV, con un IS >25.8, y una muy alta capacidad para inhibir la formación de sincicios (fusión celular) con un IS >2000. Por lo tanto el fucoidán de *C. okamuranus* fue mucho más efectivo que la Ribavirina (IS 0.78) para inhibir NDV. Resultados similares se han obtenido con otros polisacáridos sulfatados, de diferentes algas, contra varios virus envueltos (Haneji *et al.*, 2005; Ventre and Randolph, 2007; Hidari *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008), sin embargo, parece claro que las interacciones específicas entre los virus y los polisacáridos sulfatados están relacionadas con las características particulares del virus y el compuesto. Las variaciones en la secuencia de aminoácidos de las glicoproteínas de la envoltura viral resultan en una susceptibilidad diferencial a los compuestos que interactúan con ella (Hosoya *et al.*, 1991; Carlucci *et al.*, 1997; Talarico *et al.*, 2005). Estudios relacionados con el efecto antiviral del fucoidán de *Cladosiphon* contra el virus del dengue sugieren que tanto el ácido glucurónico como los residuos sulfatados de fucosa parecen afectar críticamente su efecto antiviral (Hidari *et al.*, 2005). En este estudio el fucoidán de *C. okamuranus* mostró una significativa actividad antiviral contra la infección por NDV, por lo tanto se sugiere que se trata de una inhibición específica contra NDV.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos de tiempo de adición, el fucoidán de *C. okamuranus* ejerce un efecto inhibitorio en las fases tempranas de la

infección (figura 14,15,16). Estos resultados concuerdan con trabajos previos en los que indican que los polisacáridos sulfatados provenientes de algas inhiben la infección viral al interferir con la unión y la penetración del virus a la célula hospedera (Hidari *et al.*, 2008; Ohta *et al.*, 2009).

Nosotros confirmamos la actividad antiviral del fucoidán de *C. okamuranus* por medio de Western blot utilizando la línea celular Vero infectada con NDV y tratada con fucoidán de *C. okamuranus* a diferentes tiempos de la infección. Nuestros resultados revelan una marcada inhibición en la expresión de la proteína HN, obteniendo la mayor inhibición a los 15 minutos post-infección (figura 17). Estos resultados apoyan la idea de un bloqueo por parte del fucoidán en las primeras etapas de la infección.

De acuerdo a los resultados obtenidos previamente en donde se observa que el fucoidán de *C. okamuranus* actúa en las primeras etapas de la infección, decidimos determinar el paso viral específico de la inhibición por parte del fucoidán.

La envoltura del NDV contiene dos proteínas relacionadas con la entrada viral: la proteína de unión (HN) y la proteína de fusión (F). La fusión de la envoltura viral con la membrana celular ocurre después de la unión del virus a la célula, por medio de cambios conformacionales de la proteína F, los cuales pueden ser detenidos a 4°C. La adición del fucoidán después de la unión de NDV con la célula, pudo bloquear eficientemente la infección viral (Figura 20). Estos hallazgos sugieren que el fucoidán de *C. okamuranus* inhibe la infección de NDV mediante el bloqueo de uno o más pasos posteriores a la unión del virus con la célula.

Como se describe previamente en este trabajo, aunque el primer blanco del fucoidán se sugiere ocurre en las etapas tempranas de la infección, el fucoidán inhibió la propagación de NDV célula-célula cuando se añadió al medio 12 horas post-infección. En cuanto a las cepas no virulentas de NDV, la fusión no se produce sin la adición de tripsina. En los ensayos de inhibición de fusión con la cepa La Sota nosotros solo observamos actividad antiviral cuando se añadió el fucoidán antes del corte de la proteína F, lo cual indica que el compuesto inhibe la fusión, probablemente a través de un efecto directo sobre la proteína F0 (Figura 19).

Como consecuencia de este mecanismo de acción, el fucoidán inhibe tanto la penetración de NDV a las células, como la formación de sincicios entre las células infectadas con el NDV y las células no infectadas, un proceso que mejora drásticamente la propagación de NDV y la infectividad. Nuestros resultados concuerdan con los reportados por Paskaleva *et al.*, quienes demostraron la habilidad del extracto proveniente de *Sargassum fusiforme* de inhibir los eventos de entrada de HIV y el mecanismo por el cual se propaga la infección (Paskaleva *et al.*, 2006).

En los ensayos de inhibición de la penetración viral, nosotros observamos una reducción de la infección viral cuando el fucoidán fue añadido después de la adsorción (figura 20). Los resultados sugieren que el efecto inhibitorio del fucoidán podría ser principalmente sobre la proteína F y no por un efecto en el receptor celular (la inhibición es posible cuando la proteína F queda expuesta al compuesto). Sin embargo no podemos descartar un efecto sobre la proteína HN, ya que la fusión mediada por la proteína F de NDV requiere de la participación de la proteína HN (Lamb, 1993).

Se confirmó adicionalmente la actividad antiviral del fucoidán de *C. okamuranus in ovo*, por medio de RT-PCR semicuantitativo en hígado e intestino de embrión de pollo. Nuestros resultados mostraron claramente una marcada inhibición en los niveles de RNA viral con un 40 y 99.8% de inhibición con 4 µg y 16 µg del compuesto, respectivamente. Por lo tanto; el fucoidán efectivamente inhibió la infección por NDV en embrión de pollo.

El desarrollo de resistencia a agentes antivirales se ve influenciada por diversos factores entre los cuales se encuentra el agente antiviral utilizado y la habilidad por parte del virus de mutar y convertirse en resistente; por lo cual es fundamental evaluar la generación de mutantes de nuevas drogas así como su efecto sobre las mutantes generadas por los antivirales de uso comercial. En cuanto a la obtención de mutantes virales resistentes a la ribavirina, se analizó la resistencia obtenida tras 23 pases en dosis crecientes de ribavirina, obteniendo cepas virales con una $EC_{50} > 3000$ µg/ml, mucho más alta comparada con la concentración efectiva obtenida con la cepa wild type (EC_{50}

490). Al analizar la susceptibilidad al fucoidán de *C. okamuranus* del stock viral resistente a la ribavirina, obtuvimos una EC_{50} de 60 $\mu\text{g/ml}$ por lo tanto no representa una diferencia en susceptibilidad con respecto al stock Wild-type (EC_{50} 58 $\mu\text{g/ml}$) Esto concuerda con trabajos previos, donde observaron que mutantes de VIH y HSV resistentes a medicamentos de uso clínico eran susceptibles a dextrán sulfato y carragenán respectivamente, lo cual indica la sensibilidad de las mutantes virales resistentes a antivirales de uso comercial a los polisacáridos sulfatados.

El stock viral obtenido en la inducción de resistencia viral al fucoidán de *C. okamuranus* presentó una EC_{50} de 289 $\mu\text{g/ml}$, comparado con la CE_{50} del stock Wild-type de 58 $\mu\text{g/ml}$. En el caso del fucoidán de *C. okamuranus*, se observó una menor frecuencia a inducción de mutantes virales resistentes (CE_{50} de 58 y 289 $\mu\text{g/ml}$ del stock viral Wild-type y mutante resistente respectivamente, una concentración efectiva 4.9 veces mayor), comparado con la de la ribavirina (CE_{50} de 490 y >3000 $\mu\text{g/ml}$ del stock viral Wild-type y mutante resistente respectivamente, más de 6.1 veces), por lo que sugerimos que el fucoidán además de presentar una mejor actividad antiviral contra NDV, presenta una ventaja significativa comparada con la ribavirina al inducir a menor frecuencia mutantes virales resistentes al tratamiento. Los péptidos encargados del anclaje viral son regiones altamente conservadas por lo cual es poco probable que ocurran modificaciones como consecuencia de la deriva antigénica natural del virus, Ghosh *et al* 2009 propusieron, que estos peptidos no representaban sitios frecuentes de mutación de resistencia inducida por fármacos (Ghosh *et al.*, 2009). Sin embargo, ellos mencionaron que se requería de investigación adicional para dilucidar las interrogantes de la resistencia viral inducida por los polisacáridos sulfatados.

Con el objetivo de identificar el o los sitios que confirieron resistencia al fucoidán, se aislaron 5 clonas del stock resistente al fucoidán de *C. okamuranus*, así como 4 clonas Wild-type y se secuenciaron los genes F y HN virales. Las 4 clonas Wild-type se utilizaron para obtener una secuencia consenso, y a partir de ésta y la secuencia reportada en el GenBank (No de acceso KC844235.1) comparar las secuencias de las clonas mutantes virales resistentes al fucoidán. El análisis realizado a nivel de nucleótidos arrojó 9 cambios entre la clonas wild-type y las mutantes virales resistentes

al fucoidán comprendidos entre la posición 5528 y 5589 de la región F, así como 4 cambios comprendidos entre las regiones 6674-7076 de la región HN. Al analizar las secuencias de aminoácidos obtenidos por medio de la traducción mediante el programa en línea Translate tool, en las 5 clonas mutantes virales obtenidas, se obtuvieron para la proteína de fusión: 9 sustituciones de aminoácidos en 2 clonas mutantes, 2 sustituciones en 1 clona, 1 sustitución en 1 clona y ninguna sustitución en una clona, en tanto que se localizaron en la proteína HN: 2 sustituciones aminoacídicas para una clona, Una sustitución para 2 clonas, y ninguna sustitución para 2 clonas. Adicionalmente, no se encontraron diferencias entre la clona consenso wild-type y la secuencia reportada por el GenBank con el número de acceso KC844235.1 en las regiones donde las clonas mutantes presentaron sustituciones nucleotídicas, lo que confirma que los péptidos encargados del anclaje viral son regiones altamente conservadas. Los residuos 290-357 constituyen un dominio de la proteína F el cual es invariable en las estructuras pre-y post-fusión al formar una bisagra sobre HRA y HRB durante los reordenamientos conformacionales (Kim *et al.*, 2011). Los 9 cambios que encontramos en los aminoácidos de la proteína F de las clonas 1, 3, 4 y 5 resistentes al fucoidán, se encontraron entre los aminoácidos 341 a 359, 7 de estos cambios (clonas 1, 3, 4 y 5) comprendidos en las regiones que Kim *et al* mencionan como necesarias en las estructuras de pre y post-fusión, estos resultados fortalecen los resultados que obtuvimos en los ensayos de bloqueo de la fusión por el fucoidán, el fucoidán podría estar actuando sobre esta region específica de la proteína F e impidiendo la fusión.

El proceso de fusión mediado por la mayoría de los Paramyxovirus requiere no solo del corte proteolítico de la proteína F, sino también la participación de la proteína viral HN (Lamb and Kolakofsky, 2001). La proteína F se activa por medio de la proteína HN y se somete a una serie de reordenamientos estructurales que va de un estado de prefusión a un estado postfusion (pasando por una estructura intermedia de pre-horquilla) (Plattet and Plemper, 2013). Estudios recientes de Porotto *et al.*, en 2011 con NDV sugieren que HN pudiera promover la fusión más allá de la etapa de activación F (incluso después de que la proteína F tiene alcanzado el estado pre-horquilla). Estos hallazgos alteran los modelos actuales de la maquinaria de fusión en paramixovirus y

tendría un impacto en el diseño de estrategias terapéuticas. En la actualidad, carecemos de suficiente evidencia del complejo HN/F después del inicio del replegamiento de F. (Porotto *et al.*, 2011). Es necesaria una mayor investigación respecto al mecanismo de activación, sin embargo es evidente la interacción necesaria entre la proteína HN y F durante el proceso de fusión. Gravel and Morrison utilizaron péptidos marcados con biotina con secuencias del dominio HR2 de la proteína F de NDV y detectaron una interacción específica con los aminoácidos 124 a 152 de la proteína HN viral, por lo cual sugieren que se requiere de dicha interacción para que se lleve a cabo la fusión (Gravel and Morrison, 2003). Nosotros encontramos en una clona mutante (No.2) cambios en los aminoácidos 129 y 130, mientras que en la clona mutante No. 4 encontramos un cambio en el aminoácido 129; los cuales se encuentran dentro de la región HN en la cual Gravel and Morrison sugieren como necesaria para la fusión, por lo cual los cambios encontrados en las clonas mutantes No.2 y No.4 podrían permitir un cambio conformacional de la proteína que permita la unión a la proteína F en presencia del fucoidán. A pesar de que la clona mutante No 2 no presentó cambios de aminoácidos en la proteína F, fue la que presentó mayor número de cambios en la proteína HN (cambios en los aminoácidos 129, 130 y 230) los cuales fueron suficientes para conferirle resistencia al fucoidán.

Adicionalmente se encontraron cambios en la proteína HN de la clona mutante No.2 en el aminoácido 230 y en la clona mutante No.3 en los aminoácidos 93 y 161, por lo cual probablemente la región entre los aminoácidos 93 a 230 en el caso de la proteína HN y del aminoácido 341 a 359 de la proteína F están involucrados en la resistencia al fucoidán de *C. okamuranus*.

Nuestros hallazgos sugieren que la inhibición de eventos de fusión viral (virus-célula y célula-célula) puede ser el principal responsable de la inhibición en la infectividad de NDV por parte del fucoidán de *C.okamuranus*.

Por otra parte, el fucoidán de *Cladosiphon okamuranus* inhibe NDV a concentraciones no tóxicas, por lo cual el fucoidán de *C. okamuranus* podría representar

un suplemento prometedor en el alimento para la industria aviar que podría potencialmente prevenir la infección por NDV.

9. CONCLUSIONES

El fucoidán de *C. okamuranus* presentó la mayor actividad antiviral con un IS de 2000, mientras para los extractos de *Ulva clathrata* y *M. pyrifera* los IS obtenidos fueron de 212.97 y 118.01 respectivamente. La ribavirina (antiviral de uso comercial) fue el que presentó una menor actividad contra NDV, obteniendo un IS de 1.75.

El fucoidán inhibió la infección por NDV durante la entrada viral, sin embargo no mostró efecto en etapas posteriores. Con los ensayos de inhibición de la fusión e inhibición de penetración se demostró el efecto del fucoidán sobre la acción específica en la proteína F, inhibiendo eventos de fusión viral (virus-célula y célula-célula) y como consecuencia inhibiendo la entrada del virus a la célula hospedera y su diseminación.

Se obtuvieron mutantes virales resistentes a la ribavirina, con una resistencia 6.1 veces mayor al compuesto ($EC_{50} > 3000 \mu\text{g/ml}$), y mutantes virales resistentes al fucoidán con una resistencia 4.9 veces mayor a este compuesto ($EC_{50} 289 \mu\text{g/ml}$).

Se seleccionaron 5 clonas virales resistentes al efecto del fucoidán de *C. okamuranus*, encontrando 9 cambios de aminoácidos en la proteína F que comprenden las regiones 341-359, mientras que para la proteína HN se observaron 5 substituciones de aminoácidos comprendidos entre los aminoácidos 93-230. Por lo cual se sugiere que ambas regiones están bajo presión selectiva al estar en contacto con el fucoidán de *C. okamuranus* y potencialmente ser el sitio de acción del compuesto.

Las mutantes virales resistentes a la ribavirina fueron tan susceptibles al tratamiento con fucoidán como la cepa wild type.

Las dosis efectivas contra NDV del fucoidán de *C. okamuranus* no fueron tóxicas ni para la línea celular establecida ni para el cultivo primario, inhibiendo la fusión mediante una posible interacción con las proteínas HN y F; así mismo presenta actividad inhibitoria contra las mutantes virales resistentes a la ribavirina. En 4/5 clonas virales resistentes al fucoidán se encontraron sustituciones de aminoácidos de la proteína F necesarios en las estructuras de pre y post-fusión y en 3/5 clonas, sustituciones de aminoácidos en la proteína HN en la región de interacción con F, ambas regiones necesarias para el proceso de entrada del virus y fusión célula-célula. El fucoidán de *C. okamuranus* puede ser considerado como un agente antiviral eficaz contra NDV, y podría ser un compuesto potencial para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Newcastle.

10. PERSPECTIVAS

A partir de los resultados presentados en este trabajo, se sugiere que el principal blanco de inhibición viral por parte del fucoidán de *C. okamuranus* ocurre durante la fusión viral (virus-célula y célula-célula). Por otra parte se aislaron y secuenciaron 5 clonas mutantes al efecto del fucoidán y se determinaron los cambios a nivel de aminoácidos de cada una de ellas, sin embargo queda por evaluar la EC₅₀ de cada una de las clonas mutantes a fin de relacionar los sitios de presión selectiva con la función de las proteínas F y HN.

Otro punto interesante sería evaluar el efecto del extracto purificado de *U. clathrata* y determinar IS y compararla con la del fucoidán. Así mismo evaluar el efecto de estos polisacáridos sulfatados contra otros virus de importancia en la industria avícola; como Influenza, laringotraqueitis, bronquitis aviar y Marek, pues al no existir un tratamiento contra virus de importancia aviar, el desarrollo e investigación de estos compuesto para su posterior comercialización sería de gran ayuda para el control de dichas infecciones aviares.

11. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar HC, Lee B. 2011. Emerging paramyxoviruses: molecular mechanisms and antiviral strategies. *Expert Rev Mol Med* 13: e6.

Aldous EW, Mynn JK, Banks J, Alexander DJ. 2003. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Avian Pathol* 32: 239-256.

Alexander DJ. 2000. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Rev Sci Tech* 19: 443-462.

Andrews KT, Klatt N, Adams Y, Mischnick P, Schwartz-Albiez R. 2005. Inhibition of chondroitin-4-sulfate-specific adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by sulfated polysaccharides. *Infect Immun* 73: 4288-4294.

Baba M, Nakajima M, Schols D, Pauwels R, Balzarini J, De Clercq E. 1988. Pentosan polysulfate, a sulfated oligosaccharide, is a potent and selective anti-HIV agent *in vitro*. *Antiviral Res* 9: 335-343.

Belting M, Havsmark B, Jonsson M, Persson S, Fransson LA. 1996. Heparan sulphate/heparin glycosaminoglycans with strong affinity for the growth-promoter spermine have high antiproliferative activity. *Glycobiology* 6: 121-129.

Berteau O, Mulloy B. 2003. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology* 13: 29R-40R.

Bonnie B. 1992. Antiviral Therapy: Current Concepts and Practices. *Clin Microbiol Review* 5: 146-182.

Bouhlal R, Camille H, Jean-Claude C, Sylvia C, Corinne S, Gaele S, Stephane C, Hassane R, Nathalie B. 2011. Antiviral activities of sulfated polysaccharides isolated from *Sphaerococcus coronopifolius* (Rhodophyta, Gigartinales) and *Boergeseniella thuyoides* (Rhodophyta, Ceramiales). *Marine drugs* 9: 1187-1209.

Campadelli-Fiume G, Cocchi F, Menotti L, Lopez M. 2000. The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alpha herpesviruses into cells. *Rev Med Virol* 10: 305-319.

Carlucci MJ, Scolaro LA, Errea MI, Matulewicz MC, Damonte EB. 1997. Antiviral activity of natural sulphated galactans on herpes virus multiplication in cell culture. *Planta Med* 63: 429-432.

Carlucci MJ, Scolaro LA, Damonte EB. 2002. Herpes simplex virus type 1 variants arising after selection with an antiviral carrageenan: lack of correlation between drug susceptibility and syn phenotype. *J Med Virol* 68: 92-98.

Cathomen T, Mrkic B, Spehner D, Drillien R, Naef R, Pavlovic J, Aguzzi A, Billeter MA, Cattaneo R. 1998. A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. *EMBO J* 17: 3899-3908.

Crotty S, Andino R. 2002. Implications of high RNA virus mutation rates: lethal mutagenesis and the antiviral drug ribavirin. *Microbes Infect* 4: 1301-1307.

Crotty S, Cameron C, Andino R. 2002. Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis?. *J Mol Med (Berl)* 80: 86-95.

Cruz-Suarez LE, Hernández, J., Porchas-Cornejo, M., Coronado-Molina, D.E., Linné-Unzueta Bustamante, M.L., Nieto-López, M., Tapia-Salazar, M. and Ricque-Marie, D. . 2007. The antiviral effect of algal fucoidans. *Aqua Culture Asia Pacific Magazine* 3: 19.

Cumashi A, et al. 2007. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* 17: 541-552.

Chen MZ, Xie HG, Yang LW, Liao ZH, Yu J. 2010. In vitro anti-influenza virus activities of sulfated polysaccharide fractions from *Gracilaria lemaneiformis*. *Viol Sin* 25: 341-351.

Chong HT, Kamarulzaman A, Tan CT, Goh KJ, Thayaparan T, Kunjapan SR, Chew NK, Chua KB, Lam SK. 2001. Treatment of acute Nipah encephalitis with ribavirin. *Ann Neurol* 49: 810-813.

Couch RB, Six HR. The antiviral spectrum and mechanism of action of amantadine and rimantadine. En: Mills, J., Corey, L. (Eds.). *New directions in antiviral chemotherapy*. Elsevier Science Publishing, Amsterdam 1985; 50-57.11.

Damonte EB, Matulewicz MC, Cerezo AS. 2004a. Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. *Curr Med Chem* 11: 2399-2419.

Damonte EB, Pujol CA, Coto CE. 2004b. Prospects for the therapy and prevention of dengue virus infections. *Adv Virus Res* 63: 239-285.

De Clercq E. 1982. Specific targets for antiviral drugs. *Biochem J* 205: 1-13.

De Clercq E. 2004. Antiviral drugs in current clinical use. *J Clin Virol* 30: 115-133.

De Clercq E. 2006. Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nat Rev Drug Discov* 5: 1015-1025.

Dortmans JC, Peeters BP, Koch G. 2012. Newcastle disease virus outbreaks: vaccine mismatch or inadequate application?. *Vet Microbiol* 160: 17-22.

Duarte ME, Nosedá DG, Nosedá MD, Tulio S, Pujol CA, Damonte EB. 2001. Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication *in vitro*. *Phytomedicine* 8: 53-58.

Elia G, Belloli C, Cirone F, Lucente MS, Caruso M, Martella V, Decaro N, Buonavoglia C, Ormas P. 2008. In vitro efficacy of ribavirin against canine distemper virus. *Antiviral Res* 77: 108-113.

Este JA, Schols D, De Vreese K, Van Laethem K, Vandamme AM, Desmyter J, De Clercq E. 1997. Development of resistance of human immunodeficiency virus type 1 to dextran sulfate associated with the emergence of specific mutations in the envelope gp120 glycoprotein. *Mol Pharmacol* 52: 98-104.

Ezema WS, Okoye JO, Nwanta JA. 2008. La Sota vaccination may not protect against the lesions of velogenic newcastle disease in chickens. *Trop Anim Health Prod* 41:477-484.

Farkas T, Antal M, Sami L, German P, Kecskeme S, Kardos G, Belak S, Kiss I. 2007. Rapid and Simultaneous Detection of Avian Influenza and Newcastle Disease Viruses by Duplex Polymerase Chain Reaction Assay. *Zoonoses Publ Health* 54: 38–43.

FDA. 2006. Guidance for industry antiviral product development—conducting and submitting virology studies to the agency. pp 1-14.
<http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/05d-0183-gdl0002-01.pdf>

Fenner F, Bachmann P, Gibbs E, Murphy F, Studdert M, White D. 1992. *Virologia Veterinaria*. Pages 503-514: Acribia.

Flint N, Cove FL, Evans GS. 1994. Heparin stimulates the proliferation of intestinal epithelial cells in primary culture. *J Cell Sci* 107 (Pt 2): 401-411.

Freile Y. 2001. Algas en la botica. *CINVESTAV Avance Perspectiva*. p. 283-292.

Furuta Y, Takahashi K, Shiraki K, Sakamoto K, Smee DF, Barnard DL, Gowen BB, Julander JG, Morrey JD. 2009. T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections. *Antiviral Res* 82: 95-102.

Furuta Y, et al. 2002. In vitro and in vivo activities of anti-influenza virus compound T-705. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 977-981.

Gallagher JT, Turnbull JE. 1992. Heparan sulphate in the binding and activation of basic fibroblast growth factor. *Glycobiology* 2: 523-528.

Garten W, Berk W, Nagai Y, Rott R, Klenk HD. 1980. Mutational changes of the protease susceptibility of glycoprotein F of Newcastle disease virus: effects on pathogenicity. *J Gen Virol* 50: 135-147.

Ghosh T, Chattopadhyay K, Marschall M, Karmakar P, Mandal P, Ray B. 2009. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: from structure-activity analysis to clinical evaluation. *Glycobiology* 19: 2-15.

Glabe CG, Yednock T, Rosen SD. 1983. Reversible disruption of cultured endothelial monolayers by sulphated fucans. *J Cell Sci* 61: 475-490.

Grassauer A, Weinmuellner R, Meier CH, Pretsch A, Prieschl-Grassauer E, Unger H. 2008. Iota-Carrageenan is a potent inhibitor of rhinovirus infection. *Virology* 377: 103-110.

Gravel K, Morrison TG. 2003. Interacting domains of the HN and F proteins of newcastle disease virus. *J. Virol* 77: 11040-11049.

Guideon P, Rengasamy R. 2008. Toxicological Evaluation of Fucoidan from *Cladosiphon okamuranus*. *J Med Food* 11: 638-648.

Hahnenberger R, Jakobson AM, Ansari A, Wehler T, Svahn CM, Lindahl U. 1993. Low-sulphated oligosaccharides derived from heparan sulphate inhibit normal angiogenesis. *Glycobiology* 3: 567-573.

Harden EA, Falshaw R, Carnachan SM, Kern ER, Prichard MN. 2009. Virucidal activity of polysaccharide extracts from four algal species against *Herpes simplex* virus. *Antiviral Res* 83:282-289.

Hasui M, Matsuda M, Okutani K, Shigeta S. 1995. *In vitro* antiviral activities of sulfated polysaccharides from a marine microalga (*Cochlodinium polykrikoides*) against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. *Int J Biol Macromol* 17: 293-297.

Hayashi K, Hayashi T, Kojima I. 1996. A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: in vitro and ex vivo evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12: 1463-1471.

Hayashi K, Mori J, Saito H, Hayashi T. 2006. Antiviral targets of a chromene derivative from *Sargassum micracanthum* in the replication of human cytomegalovirus. *Biol Pharm Bull* 29: 1843-1847.

Hidari KI, Takahashi N, Arihara M, Nagaoka M, Morita K, Suzuki T. 2008. Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga. *Biochem Biophys Res Commun* 376: 91-95.

Hoshino T, Hayashi T, Hayashi K, Hamada J, Lee JB, Sankawa U. 1998. An antivirally active sulfated polysaccharide from *Sargassum horneri* (TURNER) C. AGARDH. *Biol Pharm Bull* 21: 730-734.

Hosoya M, Balzarini J, Shigeta S, De Clercq. 1991. Differential inhibitory effects of sulfated polysaccharides and polymers on the replication of various myxoviruses and retroviruses, depending on the composition of the target amino acid sequences of the viral envelope glycoproteins. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 2515-2520.

Huang A, Wagner R. 1964. Penetration of herpes simplex virus into human epidermoid cells. *Proc Soc Biol Med* 116: 863-869.

Ichiyama K, Bhargavi S, Reddy G, Feng L, Xin W, Muschin T, Heinig L, Suzuki Y, Nanjundappa H, Yoshinaka Y, Ryo A, Nomura N, Eong E, Vasudevan S, Yoshida T, Yamamoto N. 2013. Sulfated polysaccharide, curdlan sulfate, efficiently prevents entry/fusion and restricts antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in vitro: a possible candidate for clinical application. *PLoS Negl Trop Dis* 10: 1371

Iqbal M, Flick-Smith H, McCauley J. 2000. Interactions of bovine viral diarrhea virus glycoprotein E(rns) with cell surface glycosaminoglycans. *J Gen Virol* 81: 4451-4459.

Itoh H, Noda H, Amano H, Ito H. 1995. Immunological analysis of inhibition of lung metastases by fucoidan (GIV-A) prepared from brown seaweed *Sargassum thunbergii*. *Anticancer Res* 15: 1937-1947.

Jassim SA, Naji MA. 2003. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *J Appl Microbiol* 95: 412-427.

- Jiao G, Yu G, Zhang J, Ewart HS. 2011.
- Jones R. 1991. Interaction of zona pellucida glycoproteins, sulphated carbohydrates and synthetic polymers with proacrosin, the putative egg-binding protein from mammalian spermatozoa. *Development* 111: 1155-1163.
- Jozwik A, Frymus T. 2005. Comparison of the immunofluorescence assay with RT-PCR and nested PCR in the diagnosis of canine distemper. *Vet Res Commun* 29: 347-359.
- Kim YH, Donald JE, Grigoryan G, Leser G, Fadeev AY, Lamb RA, DeGrado WF. 2011. Capture and imaging of a prehairpin fusion intermediate of the paramyxovirus PIV5. *PNAS* 20993-20997.
- Kimura K, Mori S, Tomita K, Ohno K, Takahashi K, Shigeta S, Terada M. 2000. Antiviral activity of NMSO₃ against respiratory syncytial virus infection *in vitro* and *in vivo*. *Antiviral Res* 47: 41-51.
- Lahaye M, Robic A. 2007. Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules* 8: 1765-1774.
- Laliberte JP, McGinnes LW, Peeples ME, Morrison TG. 2006. Integrity of membrane lipid rafts is necessary for the ordered assembly and release of infectious Newcastle disease virus particles. *J Virol* 80: 10652-10662.
- Lamb RA. 1993. Paramyxovirus fusion: a hypothesis for changes. *Virology*. 197: 1-11.
- Lamb RA, Kolakofsky D. 2001. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. Philadelphia: In field Virology.
- Lamb R, Paterson R, Jardetzky T. 2006. Paramyxovirus membrane fusion: Lessons from the F and HN atomic structures. *Virology* 344: 30-37.
- Lee JB, Hayashi K, Hashimoto M, Nakano T, Hayashi T. 2004. Novel antiviral fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* (Mekabu). *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 52: 1091-1094.

Leysen P, De Clercq E, Neyts J. 2008. Molecular strategies to inhibit the replication of RNA viruses. *Antiviral Res* 78: 9-25.

Lins KO, Bezerra DP, Alves AP, Alencar NM, Lima MW, Torres VM, Farias WR, Pessoa C, Moraes MO, Costa-Lotufo LV. 2009. Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer). *J Appl Toxicol* 29:20-26.

Lodish H, Berk A, Zipursk S, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. 2002. *Biología Celular y Molecular: Panamericana España* pp 80-120

Luscher-Mattli M. 2000. Polyanions a lost chance in the fight against HIV and other virus diseases. *Antivir Chemistry Chemother* 11: 249-259.

Lynch G, Low L, Li S, Sloane A, Adams S, Parish C, Kemp B, Cunningham AL. 1994. Sulfated polyanions prevent HIV infection of lymphocytes by disruption of the CD4-gp120 interaction, but do not inhibit monocyte infection. *J Leukoc Biol* 56: 266-272.

Malhotra R, Ward M, Bright H, Priest R, Foster MR, Hurle M, Blair E, Bird M. 2003. Isolation and characterisation of potential respiratory syncytial virus receptor(s) on epithelial cells. *Microbes Infect* 5: 123-133.

McCarthy B. 2007. Antivirals--an increasingly healthy investment. *Nat Biotechnol* 25: 1390-1393.

McGinnes LW, Pantua H, Reitter J, Morrison TG. 2006. Newcastle Disease Virus: propagation, quantification, and storage. *Curr Protoc Microbiol* 1:15F.2.1–15F.2.18.

Moll B, Vega G, Beltran J. 2005. Managed co-cultures of organisms having prophylactic and health-promoting effects. *Patente USA*.

Mori N, Nakasone K, Tomimori K, Ishikawa C. 2012. Beneficial effects of fucoidan in patients with chronic hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 18: 2225-2230.

Nagai Y, Klenk HD, Rott R. 1976. Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology* 72: 494-508.

Nagai Y, Inocencio NM, Gotoh B. 1991. Paramyxovirus tropism dependent on host proteases activating the viral fusion glycoprotein. *Behring Inst Mitt* 35-45.

Nagaoka M, Shibata H, Kimura-Takagi I, Hashimoto S, Kimura K, Makino T, Aiyama R, Ueyama S, Yokokura T. 1999. Structural study of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* TOKIDA. *Glycoconj J* 16: 19-26.

Nakashima H, Kido Y, Kobayashi N, Motoki Y, Neushul M, Yamamoto N. 1987. Antiretroviral activity in a marine red alga: Reverse transcriptase inhibition by an aqueous extract of *Schizymenia pacifica*. *J Cancer Res* 113: 413-416.

Nguyen TL, Chen J, Wang D, Fan Y, Wang J, Zhang J, Qin T, Chen X, Chen X, Khakame SK, Dang BK. 2012. In vitro antiviral activity of sulfated *Auricularia auricula* polysaccharides. *Carbohydr Polym* 90: 1254-1258.

Ohta Y, Lee JB, Hayashi K, Hayashi T. 2009. Isolation of sulfated galactan from *Codium fragile* and its antiviral effect. *Bio. Pharm Bull* 32: 892-898.

Olofsson S, Bergstrom T. 2005. Glycoconjugate glycans as viral receptors. *Ann Med* 37: 154-172.

Pacheco-Ruiz I, Zertuche-González J, Chee-Barragán A, Arroyo-Ortega E. 2002. Biomass and potential commercial utilization of *Ulva lactuca* (Chlorophyta, Ulvaceae) beds along the North West coast of the Gulf of California. *Phycologia* 41: 199-201.

Parish C, Rylatt D, Snowden J. 1984. Demonstration of lymphocyte surface lectins that recognize sulphated polysaccharides. *Journal of Cell Science* 67 145-158.

Parker WB. 2005. Metabolism and antiviral activity of ribavirin. *Virus Res* 107: 165-171.

Paskaleva E, Lin X, Li W, Cotter R, Klein M, Roberge E, Yu E, Clark B, Veille JL, Liu Y, Lee D, Canki M. 2006. Inhibition of highly productive HIV-1 infection in T cells, primary human macrophages, microglia, and astrocytes by *Sargassum fusiforme*. *AIDS Res Ther* 3:15.

Penn C. 2009. Points to Consider: Antiviral Drug Resistance. WHO pp1-2.

Pillay D. 2007. The priorities for antiviral drug resistance surveillance and research. *J Antimicrob Chemother* 60 Suppl 1: i57-58.

Platt N, Gordon S. 2001. Is the class A macrophage scavenger receptor (SR-A) multifunctional? - The mouse's tale. *J Clin Invest* 108: 649-654.

Plattet P, Plemper R. 2013. Envelope protein dynamics in Paramyxovirus entry. *mBio* 4: 413-13.

Pomin VH, Pereira MS, Valente AP, Tollefsen DM, Pavao MS, Mourao PA. 2005. Selective cleavage and anticoagulant activity of a sulfated fucan: stereospecific removal of a 2-sulfate ester from the polysaccharide by mild acid hydrolysis, preparation of oligosaccharides, and heparin cofactor II-dependent anticoagulant activity. *Glycobiology* 15: 369-381.

Ponce NM, Pujol CA, Damonte EB, Flores ML, Stortz CA. 2003. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. *Carbohydr Res* 338: 153-165.

Porotto M, DeVito I, Palmer SG, Jurgens EM, Yee JL, Yokoyama CC, Pessi A, Moscona A. 2011. Spring-loaded model revisited: paramyxovirus fusion requires engagement of a receptor binding protein beyond initial triggering of the fusion protein. *J. Virol* 85:12867–12880

Preeprame S, Hayashi K, Lee J, Sankawa U, Hayashi T. 2001. A novel antivirally active fucan sulfate derived from an edible brown alga, *Sargassum horneri*. *Chem Pharm Bull* 49: 484-485.

Pujol CA, Scolaro LA, Ciancia M, Matulewicz MC, Cerezo AS, Damonte EB. 2006. Antiviral activity of a carrageenan from *Gigartina skottsbergii* against intraperitoneal murine herpes simplex virus infection. *Planta Med* 72: 121-125.

Pujol CA, Ray S, Ray B, Damonte EB. 2012. Antiviral activity against dengue virus of diverse classes of algal sulfated polysaccharides. *Int J Biol Macromol* 51: 412-416.

Queiroz KC, Assis CF, Medeiros VP, Rocha HA, Aoyama H, Ferreira CV, Leite EL. 2006. Cytotoxicity Effect of Algal Polysaccharides on HL60 Cells. *Biochemistry* 71: 1312-1315.

Rodríguez P. 2009. Acción antiviral del polisacárido sulfatado fucoidán extraído de *Cladosiphon okamuranus* sobre el virus aviar Newcastle (cepa La Sota) pp 42-59.

Romanos MT, Andrada-Serpa MJ, Mourão PA, Yoneshigue-Valentin Y, Costa SS, Pereira MS, Miranda MM, Gonçalves JL, Wigg MD. 2002. A sulphated fucan from the *Laminaria abyssalis* inhibits the human T cell lymphotropic virus type 1-induced syncytium formation in HeLa cells. *Antivir Chem Chemother*. 13: 219-221

Scagliarini A, Vaccari F, Gallina L, Pozzo FD, Prosperi S. 2006. *In vitro* evaluation of antiviral activity of ribavirin against canine Distemper Virus. *Veterinary Research Communications* 30: 269-272.

Schaeffer DJ, Krylov VS. 2000. Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria. *Ecotoxicol Environ Saf* 45: 208-227.

Shope R. 1964. Introduction: The birth of a new Disease. *Newcastle Disease Virus: Hanson*, pp 3-22.

Snell NJ. 2001. Ribavirin--current status of a broad spectrum antiviral agent. *Expert Opin Pharmacother* 2: 1317-1324.

Song X, Yin Z, Zhao X, Cheng A, Jia R, Yuan G, Xu J, Fan Q, Dai S, Lu H, Ly C, Liang X, He C, Su G, Zhao L, Ye G, Shi F. 2013. Antiviral activity of sulfated *Chuanmingshen violaceum* polysaccharide against Newcastle disease virus. *J Gen Virol* 94: 2164-2174.

Takahashi Y, Uehara K, Watanabe R, Okumura T, Yamashita T, Omura H, Yomo T, Kawano T, Kanemitsu A, Narasaka H, Suzuki N, Itami T. 1998. Efficacy of oral administration of fucoidan a sulfated polysaccharide, in controlling white spot syndrome in Kuruma shrimp in Japan. *Advances in shrimp biotechnology*, Flegel, T.W. (Ed.).

National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, Thailand, pp 171-173.

Talarico LB, Pujol CA, Zibetti RG, Faria PC, Nosedá MD, Duarte ME, Damonte EB. 2005. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. *Antiviral Res* 66: 103-110.

Trejo-Avila L, Cruz-Suárez L, Rodríguez-Padilla C, Ricque-Marie D. 2008. Uso de fucoídán de *Cladosiphon okamuranus* como agente protector contra microorganismos patógenos. Mexico: Mex Pat Appl Patente en trámite

Utt M, Wadstrom T. 1997. Identification of heparan sulphate binding surface proteins of *Helicobacter pylori*: inhibition of heparan sulphate binding with sulphated carbohydrate polymers. *J Med Microbiol* 46: 541-546.

Ventre K, Randolph AG. 2007. Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract in infants and young children. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;4:CD000181

Vicente CP, He L, Pavao MS, Tollefsen DM. 2004. Antithrombotic activity of dermatan sulfate in heparin cofactor II-deficient mice. *Blood* 104: 3965-3970.

Villegas P. 1998. Viral diseases of the respiratory system. *Poult. Sci.* 77:1143–1145.1998.

Waihenya RK, Mtambo MA, Nkwengulila. 2002. Evaluation of the efficacy of the crude extract of *Aloe secundiflora* in chickens experimentally infected with Newcastle disease virus. *J Ethnopharmacol* 79: 299-304.

Wallace RJ, Oleszek W, Franz C, Hahn I, Baser KH, Mathe A, Teichmann K. 2010. Dietary plant bioactives for poultry health and productivity. *Br Poult Sci* 51: 461-487.

Wang J, Hu Y, Wang D, Zhang F, Zhao X, Abula S, Fan Y, Guo L. 2010. *Lycium barbarum* polysaccharide inhibits the infectivity of Newcastle disease virus to chicken embryo fibroblast. *Int J Biol Macromol* 46: 212-216.

Willenborg DO, Parish CR. 1988. Inhibition of allergic encephalomyelitis in rats by treatment with sulfated polysaccharides. *J Immunol* 140: 3401-3405.

Witvrouw M, De Clercq E. 1997. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *Gen Pharmacol* 29: 497-511.

Yasuhara-Bell J, Lu Y. 2010. Marine compounds and their antiviral activities. *Antiviral Res* 86: 231-240.

Yip GW, Smollich M, Gotte M. 2006. Therapeutic value of glycosaminoglycans in cancer. *Mol Cancer Ther* 5: 2139-2148.

Zhu W, Ooi VE, Chan PK, Ang PO, Jr. 2003. Isolation and characterization of a sulfated polysaccharide from the brown alga *Sargassum* patterns and determination of its anti-herpes activity. *Biochem Cell Biol* 81: 25-33.

APÉNDICE

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

- Acrilamida/Bisacrilamida

- 87.6 g de Acrilamida
- 2.4 g de Bisacrilamida

Aforar a 300 ml con agua destilada.

- SDS 10% (w/v)

- 10 g de SDS

Aforar a 100 ml con agua destilada.

- Tris-HCl 1.5 M pH 8.8

- 27.23g de Tris base

Ajustar a pH 8.8 con HCl y aforar a 150 ml con agua destilada.

- Tris HCl 0.5 M pH 6.8

- 6 gr Tris base

Ajustar a pH 6.8 con HCl y aforar a 100 ml con agua destilada.

- Buffer de Desnaturalización

- 1.25 ml Tris-HCl 0.5M pH 6.8
- 2.5 ml Glicerol
- 2 ml SDS 10 %
- .2 ml Azul de Bromofenol
- 3.55 ml Agua destilada

Añadir 50µl de b-mercaptoetanol a 950 de buffer de muestra. Diluir las muestras 1:1
Con el buffer y calentarlas a 95° C por 4 minutos.

- Buffer de Corrida 10X

- 30.3gr Tris Base
- 144 gr Glicina
- 10gr SDS

Aforar a 1 litro con agua destilada.

- Persulfato de amonio (PSA) 10%
 - 100mg PSAAforar a 1 ml de agua destilada.

- Solución de Tinción 74
 - 50 ml de Metanol
 - 7 ml de Ácido acético
 - 0.05 g Azul de comassieAforar a 100 ml con agua destilada.

- Solución para desteñir
 - 165 ml de Metanol
 - 50 ml de ácido acéticoAforar a 1 litro con agua destilada.

- Buffer de Transferencia 5X
 - 14.5 g Glicina
 - 29 g Tris Base
 - 200 ml de MetanolAforar a 1 litro con agua destilada.

- PBS 10 X
 - 80 g NaCl
 - 2 gr KCl
 - 14.4 g Na₂HPO₄
 - 2.4 g KH₂PO₄Ajustar a pH 7.4 con HCl y aforar a 1 litro con agua destilada.

- Buffer de Bloqueo
 - 1 ml de PBS 10X
 - 0.5 gramos de BSA
 - 10 µl de tritón x-100Aforar a 10 ml con agua destilada.

- Buffer de Lavados
 - 40 ml PBS 10X
 - 0.4 ml tritónAforar a 400 ml con agua destilada.

- Anticuerpo dilución 1:1000
 - 1 ml PBS 10 X
 - 0.1 gramos BSA
 - 10 µl del anticuerpoAforar a 10 ml con agua destilada.

- TBE 10X

Reactivo	Unidad
Tris Base	108 g
Ácido Bórico	55 g
EDTA	7.4g
Agua Destilada Estéril 1 litro.	

- Agarosa al 1.5 %
Agarosa 1.5gr
Buffer TBE 1X 100ml.

- Metanol-Acetona
500 ml de Metanol
500 ml de Acetona

RESUMEN BIOGRÁFICO

Regina Elizondo González

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: **MECANISMO DE ACCIÓN ANTIVIRAL DE POLISACÁRIDOS SULFATADOS DE ALGAS SOBRE EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE.**

Campo de estudio: Virología.

Datos personales: Nacida en Monterrey Nuevo León el 26 de Noviembre de 1983.

Educación:

- Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, obteniendo el grado de Maestro en Ciencias con Acentuación en Microbiología 2006-2008
- Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León grado obteniendo el grado de Químico Bacteriólogo Parasitólogo 2000-2004.

Experiencia Profesional:

- Gerente del área de Aseguramiento de Calidad en la empresa Aonori Aquafarms (Junio 2012 a la fecha).
- Investigador Químico en el área de Investigación y Desarrollo en la empresa Químiproducos por un periodo de 8 meses en el 2006.
- Prácticas profesionales realizadas en Químiproducos (6 meses) en el 2005.
- Estancia en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina (UANL) a cargo de la Dra. Ana María Rivas Estilla (2005-2008).

Distinciones:

- Premio a la Mejor Tesis de Licenciatura convocado por la Universidad Autónoma de Nuevo León en el año 2007.

- Segundo Lugar en el Certamen Foro de Investigación XXX Aniversario UMAE Hospital de Especialidades No. 25 realizado en junio del 2010, con el trabajo “Actividad Antiviral de los Polisacáridos Sulfatados Provenientes de Algas contra el Virus de la Enfermedad de Newcastle.

Presentaciones en Congresos:

- Benjamin Moll, Alberto Peña, Francisco Magallon, Elizabeth Cruz, **Regina Elizondo**. 2014. Sustainable Farming of Ulva and native brown shrimp in Mexico. **Aquaculture America 2014**. Seattle, Washington.
- Trejo-Avila LM, **Elizondo-González R**, Cruz-Suarez E, Ricque-Marie D, Rodriguez-Padilla C. 2012. Antiviral Activity of Fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* against Paramyxoviruses. **13th Congress of the International Society for Ethnopharmacology**. Graz, Austria.
- Trejo-Ávila LM, **Elizondo-González R**, Rodríguez Padilla C, Cruz-Suarez E, Ricque-Marie D. 2012. Antiviral Activity and Mechanism of Action of Fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* against Newcastle Disease Virus. **International Symposium on Alternatives to Antibiotics: Challenges and Solutions in Animal Production**. Paris, Francia.
- **Elizondo-González R**, Peña-Rodríguez A, Cruz-Suarez E, Ricque-Marie D, Trejo-Ávila L. 2011. Mecanismo de Acción Antiviral del Fucoidán de *Cladosiphon okamuranus* contra Paramyxovirus *in vitro*. **XXVI Congreso Nacional de Investigación en Medicina**.
- **Elizondo-González R**, Ávila-Herrera KJ, Peña-Rodríguez A, Cruz-Suárez E, Ricque-Marie D, Rodríguez-Padilla C, Trejo-Ávila L. 2010. Actividad Antiviral y nivel de Acción de Polisacáridos Sulfatados Provenientes de Algas contra el Virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV). **II Congreso Latinoamericano de Biotecnología Ambiental y Algal**. Cancún Qto Roo. México.
- **Elizondo-González R**, Ávila-Herrera KJ, Peña-Rodríguez A, Cruz-Suárez E, Ricque-Marie D, Rodríguez-Padilla C, Trejo-Ávila L. 2010. Actividad Antiviral de Polisacáridos Sulfatados provenientes de algas contra el Virus de la Enfermedad de Newcastle. **Foro de investigación "XXX aniversario UMAE Hospital de especialidades No. 25**. Monterrey, N.L. México.
- **Elizondo-González R**, Rodríguez-Santillán P, Ávila-Herrera KJ, Cruz-Suárez E, Rique-Marie D, Rodríguez-Santillán C, Trejo-Ávila L. 2009. Actividad Antiviral del Fucoidán de *Cladosiphon okamuranus* contra el Virus de la Enfermedad de Newcastle. “**6ª Jornada de Actividades Botánicas Biol. Humberto Sánchez Vega**”. Monterrey N.L. México.
- **Elizondo-González R**, Rodríguez-Santillán P, Ávila-Herrera KJ, Cruz-Suárez E, Rique-Marie D, Rodríguez-Santillán C, Trejo-Ávila L. 2009. Actividad Antiviral del Fucoidán contra el virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV) en la línea celular VERO y en huevos embrionados de pollo. **XXV Congreso Nacional de Investigación Biomédica**. Monterrey, N.L. México.
- **Elizondo-González R**, Trujillo Murillo K, Zapata-Benavides P, Rodríguez-Padilla C, Rivas-Estilla AM, Trejo-Ávila L. 2007. Inhibición de la Replicación y

expresión génica del virus de la hepatitis C con un RNA de Interferencia. **XXIV Congreso Nacional de Investigación Biomédica**. Monterrey, NL. México.

- **Elizondo-González R**, Trujillo Murillo K, Zapata-Benavides P, Rodríguez-Padilla C, Trejo-Avila L, Rivas-Estilla AM. 2007. Inhibición de la Replicación y expresión génica del virus de la hepatitis C con un RNA de Interferencia. **XII Congreso de Investigación en Salud Pública**. Cuernavaca, Morelos, México.
- **Elizondo-González R**, Trujillo Murillo K, Zapata-Benavides P, Rodríguez-Padilla C, Rivas-Estilla AM, Trejo-Ávila L. 2006. Inhibición de la Replicación y expresión génica del virus de la hepatitis C con un RNA de Interferencia. **XXX Congreso Panamericano de Gastroenterología**. Cancún QR. México.

Artículos de Difusión Científica:

- **Regina Elizondo-González**; Elizabeth Cruz-Suárez; Denis Ricque-Marie; Alberto Peña-Rodríguez; Cristina Rodríguez-Padilla; Laura M Trejo-Avila. Recursos Algales como fuente de Nuevos y Mejores Antivirales. 2010. **Algas**. P. 9

Artículos publicados:

- **Regina Elizondo-Gonzalez**; L Elizabeth Cruz-Suarez; Denis Ricque-Marie, Edgar Mendoza-Gamboa; Cristina Rodriguez-Padilla; Laura M Trejo-Avila. *In vitro* characterization of the antiviral activity of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* against Newcastle Disease Virus. 2012. **Virology Journal**. 9:307
- Laura Trejo-Ávila; **Regina Elizondo-González**; Karina del C. Trujillo-Murillo; Pablo Zapata-Benavides; Cristina Rodríguez-Padilla; Ana María Rivas-Estilla. Antiviral therapy: Inhibition of Hepatitis C Virus expression by RNA interference directed against the NS5B region of the Viral Genome. 2007. **Annals of Hepatology**. 6(3).174-180