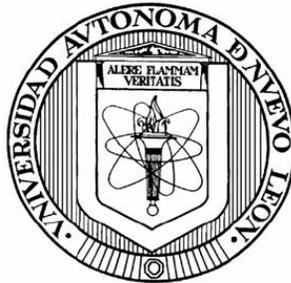


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



ACCIÓN ANTIVIRAL DEL POLISACÁRIDO SULFATADO FUCOIDÁN EXTRAÍDO
DE *Cladosiphon okamuranus* SOBRE EL VIRUS AVIAR NEWCASTLE (cepa LaSota)

Por:

M.V.Z. PATRICIA RODRÍGUEZ SANTILLÁN

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS
Con especialidad en MICROBIOLOGÍA

Noviembre, 2008

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



ACCIÓN ANTIVIRAL DEL POLISACÁRIDO SULFATADO FUCOIDÁN EXTRAÍDO
DE *Cladosiphon okamuranus* SOBRE EL VIRUS AVIAR NEWCASTLE (cepa LaSota)

Por:

M.V.Z. PATRICIA RODRÍGUEZ SANTILLÁN

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS
Con especialidad en MICROBIOLOGÍA

Noviembre, 2008

ACCIÓN ANTIVIRAL DEL POLISACÁRIDO SULFATADO FUCOIDÁN
EXTRAÍDO DE *Cladosiphon okamuranus* SOBRE EL VIRUS AVIAR
NEWCASTLE (cepa LaSota)

Comité de Tesis

Director de Tesis

DRA LAURA M. TREJO ÁVILA

Secretario

DRA ELIZABETH CRUZ SUAREZ

Vocal

DR. PABLO ZAPATA BENAVIDES

AREA DE TRABAJO

UNIDAD DE VIROLOGÍA Y CÁNCER DEL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA LAURA TREJO ÁVILA.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	vii
DEDICATORIAS	viii
LISTA DE TABLAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
NOMENCLATURA.....	xi
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	3
3. OBJETIVOS	
3.1 Objetivo general.....	4
3.2 Objetivos particulares.....	5
4. ANTECEDENTES.....	6
4.1 Agentes antivirales.....	6
4.1.1 Antivirales y su mecanismo de acción.....	6
4.1.2 Agentes antivirales de origen natural.....	9
4.1.2.1 Algas Marinas.....	9
4.1.2.1.1 Algas Pardas.....	10
4.1.2.1.2 <i>Cladosiphon okamuranus</i>	11
4.1.2.2 Polisacáridos sulfatados.....	11
4.1.2.2.1 Actividad antiviral.....	11
4.1.2.3 Fucoidán.....	12
4.1.2.3.1 Estructura y composición.....	12
4.1.2.3.2 Actividad antiviral.....	13
4.1.2.3.2.1 Dosis efectivas “ <i>in vitro</i> ”.....	15

4.1.2.3.2.2 Dosis efectivas “ <i>in vivo</i> ”	15
4.1.2.3.3 Otras propiedades bioactivas.....	16
4.1.2.4 Recursos algales de México.....	16
4.2 Control de enfermedades virales en la industria avícola.....	17
4.2.1 Producción avícola.....	17
4.2.2 Virus envueltos de importancia aviar.....	
4.2.2.1 Influenza Aviar (Orthomixovirus).....	
4.2.2.2 Laringotraqueítis (Herpesvirus).....	
4.2.2.3 Enfermedad de Newcastle.....	
4.2.2.3.1 Características del virus.....	
4.2.2.3.2 Ciclo replicativo.....	
4.2.2.3.3 Signos clínicos.....	
4.2.2.3.4 Modo de propagación.....	
4.2.2.3.5 Huéspedes.....	
4.2.2.3.6 Distribución geográfica.....	
4.2.2.3.7 Vacunación y sus efectos adversos.....	
4.2.3 Agentes antivirales en la industria avícola.....	
5. MÉTODOS.....	
Diseño experimental.....	
5.1 Extracto de fucoidán.....	
5.1.1 Preparación del Stock.....	
5.2 Evaluación del efecto citotóxico de fucoidán.....	
5.2.1 “ <i>in ovo</i> ”.....	
5.2.1.1 Determinación de la viabilidad de los embriones.....	
5.2.1.2 Inoculación por vía alantoidea de fucoidán.....	
5.2.1.3 Análisis de los embriones inoculados con el fucoidán.....	
5.2.2 “ <i>in vitro</i> ”.....	
5.2.2.1 Obtención de Cultivo Primario de Fibroblastos de Embrión de Pollo (CPFEP).....	
5.2.2.2 Determinación del efecto del fucoidán sobre la viabilidad celular por la técnica colorimétrica basada en la reducción de la sal de Tetrazoilo (MTT).....	
5.3 Efecto antiviral.....	
5.3.1 Propagación del virus NDV en embrión de pollo.....	
5.3.2 Titulación del virus de Newcastle por Microhemoaglutinación...	
5.3.3 Titulación del NDV por DICT50.....	
5.3.4 Evaluación del efecto antiviral “ <i>in ovo</i> ”.....	
5.3.4.1 Fucoidán aplicado una h antes de la infección viral (H -1).....	
5.3.4.2 Fucoidán aplicado al mismo tiempo de la infección viral (H 0).....	
5.3.4.3 Fucoidán aplicado una h después de la infección viral (H 1).....	
5.3.4.4 RT-PCR.....	
5.3.4.4.1 Extracción de RNA viral a partir	

del fluido alantoideo.....	
5.3.4.4.2 Síntesis del DNAc.....	
5.3.4.4.3 PCR.....	
5.3.5 Ensayo antiviral “ <i>in vitro</i> ”.....	
5.3.5.1 Cultivo de células VERO.....	
5.3.5.2 Inhibición de sincicios por fucoidán.....	
5.3.5.3 Disminución de proteínas virales por efecto de fucoidán.....	
5.3.5.3.1 Extracción de proteínas.....	
5.3.5.3.2 Western Blot.....	
5.3.5.3.2.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	
5.3.5.3.2.2 Transferencia a membrana de nitrocelulosa.....	
5.3.5.3.2.3 Inmunodetección.....	
5.4. Análisis Estadístico.....	
6. RESULTADOS.....	
6.2 Evaluación del efecto citotóxico de fucoidán.....	
6.2.1 Efecto citotóxico “ <i>in ovo</i> ” en embrión de pollo.....	
6.2.2 Efecto citotóxico “ <i>in vitro</i> ” en cultivo secundario de fibroblastos de embrión de pollo.....	
6.3 Efecto Antiviral.....	
6.3.1 Obtención del título del virus de Newcastle por microhemoaglutinación.....	
6.3.2 Obtención del título del virus Newcastle por dosis infectiva en cultivo de tejidos al 50% (DICT ₅₀).....	
6.3.3 Evaluación del efecto antiviral “ <i>in ovo</i> ”.....	
6.3.3.1 Inhibición de la adsorción viral por bloqueo de receptores celulares (Hora -1) “ <i>in ovo</i> ”.....	
6.3.3.2 Inhibición de la adsorción por bloqueo de receptores virales y/o celulares por competencia. (Hora 0) “ <i>in ovo</i> ”.....	
6.3.3.3 Inhibición de eventos post-adsorción de la infección viral (Hora 1) “ <i>in ovo</i> ”.....	
6.3.3.4 Evaluación de la inhibición de biosíntesis viral por PCR....	
6.3.4. “ <i>in vitro</i> ”.....	
6.3.4.1 Inhibición de la fusión celular.....	
6.3.4.2 Comparación entre eficacia y toxicidad del fucoidán.....	
6.3.4.3 Evaluación de la inhibición de la biosíntesis viral por Western Blot.....	
7. DISCUSIÓN.....	

8. CONCLUSIONES.....

APÉNDICE.....

LITERATURA CITADA.....

1. INTRODUCCIÓN

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.

El NDV (Newcastle Disease Virus) es causante de la Enfermedad de Newcastle (ENC), esta enfermedad es una de las patologías más temidas por los productores avícolas, debido a la alta morbilidad y mortalidad que ocasiona, generando, en consecuencia, cuantiosas pérdidas económicas y menor disponibilidad de una de las proteínas de origen animal con alto valor nutritivo y de fácil adquisición.

El NDV es un virus RNA envuelto perteneciente a la familia *paramixoviridae* (patotipos: velogénico viserotrópico, velogénico neurotrópico, mesogénico, lentogénico y entérico asintomático) (Beard y Hanson, 1984). Cuando se presenta la enfermedad causada por las cepas virulentas (patotipos: velogénico viserotrópico, velogénico neurotrópico, mesogénico), tienen que ser reportadas obligatoriamente a la Oficina Interacional de Epizootias (OIE) (Alexander *et al.*, 2000).

La única manera de erradicar la ENC de las aves de corral comerciales, hasta hoy, es destruyendo rápidamente todas las parvada infectadas e imponiendo una cuarentena estricta y programas de vacunación que contemplan varias aplicaciones 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).

Los virus son parásitos intracelulares obligados que dependen de las vías bioquímicas y metabólicas de las células que infectan, es difícil alcanzar una actividad antiviral sin afectar el metabolismo normal de la célula infectada, causando también

efectos tóxicos en éstas. La industria avícola no maneja ningún compuesto terapéutico o profiláctico debido a que no existen antivirales de baja toxicidad para las enfermedades virales aviares.

Desde hace 30 años las algas marinas han sido reconocidas como fuentes potenciales de sustancias con propiedades farmacológicas. Se ha encontrado que algunos polisacáridos sulfatados de algas marinas poseen interesantes propiedades biológicas como actividad anticoagulante, antitumoral y antiviral (Chapman y Chapman 1980).

El fucoidán es un polisacárido sulfatado complejo extraído de la pared celular de muchas algas pardas, y se ha demostrado que tiene actividad antiviral “*in vitro*” sobre virus envueltos DNA o RNA incluyendo herpes simple (HSV) y citomegalovirus (CMV) (Baba *et al.*, 1988), HIV (Lynch *et al.*, 1994), fiebre porcina africana (ASFV) (García-Villalón y Gil-Fernández, 1991), HTLV-1 (Romanos *et al.*, 2002) y virus respiratorio sincicial (RSV) miembro de la familia *Paramyxoviridae* (Malhotra *et al.*, 2003). También se demostró actividad antiviral “*in vivo*” contra el virus de la mancha blanca, previniendo la infección en camarones (Takahashi *et al.*, 1998; Cruz *et al.*, 2007).

En investigaciones recientes nuestro grupo (Morales, 2008) demostró que el fucoidán extraído del alga café *Cladosiphon okamuranus* inhibió al virus DCV (*Distemper canino*) a concentraciones no tóxicas.

El empleo del fucoidán como preventivo y /o como terapia combinada con otras sustancias de uso clínico en la industria avícola sería una alternativa potencial para la prevención y control de esta enfermedad, además, podría ser una práctica más económica.

A través de este proyecto se evaluó el efecto antiviral del fucoidán de *C. okamuranus* sobre el virus de Newcastle (cepa LaSota) perteneciente a la familia *Paramyxoviridae* en modelos “*in vitro*” e “*in ovo*”.

2. HIPOTESIS

El polisacárido sulfatado “fucoidán” extraído del alga café *Cladosiphon okamuranus* presentará actividad antiviral contra el virus Newcastle (Cepa LaSota) en cultivo de células VERO y embrión de pollo, sin efecto citotóxico.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Determinar el grado de efecto antiviral del polisacárido sulfatado fucoidán del *Cladosiphon okamuranus* “*in ovo*” en embrión de pollo e “*in vitro*” en cultivo celular, frente al virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV cepa LaSota).

3.2. Objetivos particulares

- Evaluar la citotoxicidad del fucoídán extraído de *Cladosiphon okamuranus* “*in vitro*” en cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo e “*in ovo*” en embriones de pollo de 9 días.
- Evaluar la actividad antiviral del fucoídán contra NDV (Cepa LaSota) “*in ovo*” y la etapa del ciclo viral en donde ejerce esta actividad.
- Evaluar la actividad del fucoídán “*in vitro*” sobre el efecto citopático del virus (formación de sincicios).
- Evaluar la actividad del fucoídán “*in vitro*” sobre la biosíntesis de proteínas virales.

4. ANTECEDENTES

4.1. Agentes Antivirales

Los virus utilizan la maquinaria celular para la replicación y síntesis de sus ácidos nucleicos y la transcripción de la información genética. Por eso, cualquier inhibidor de la replicación viral puede también afectar a la célula, ser citotóxico y causar su muerte (Dewhurst, 2004).

El desarrollo de la biología molecular ha permitido conocer las distintas etapas de la multiplicación de los ácidos nucleicos y expresión de las proteínas de los virus, permitiendo identificar enzimas únicas en la duplicación viral y de esta manera distinguir claramente entre funciones del virus y de la célula hospedera (Barreto *et al.*, 1998). Como ejemplos se mencionan la timidina-quinasa del virus herpes simple y la transcriptasa reversa del virus de inmunodeficiencia humana (Elion *et al.*, 1977). Estos pasos pueden constituir puntos críticos o blancos donde actúen sustancias químicas de origen natural o diseñadas especialmente mediante técnicas sofisticadas que entorpecen, e incluso detienen la duplicación viral (Barreto *et al.*, 1998).

Otros puntos críticos para inhibir la replicación viral son los primeros pasos de interacción de un virus con la célula hospedera; es primordial la identificación de nuevas drogas que actúen a nivel de la entrada del virus, inhibiendo la interacción de las glicoproteínas virales con receptores celulares, la fusión del virus con la membrana celular, o bien el desnudamiento del mismo en el interior de ésta (Altmeyer, 2004).

4.1.1. Antivirales y su Mecanismo de Acción

Los antivirales son aquellos compuestos capaces de inhibir una o varias etapas del ciclo viral dentro de la célula huésped (Perez y Ramos, 1990). Para comprender el mecanismo de acción de los fármacos antivirales, es necesario conocer el ciclo vital completo de un virus típico, que puede ser desglosado en 5 pasos o etapas: (*figura 1*)

1. Adhesión.

2. Penetración.
3. Duplicación del genoma viral.
4. Morfogénesis o ensamblaje
5. Liberación

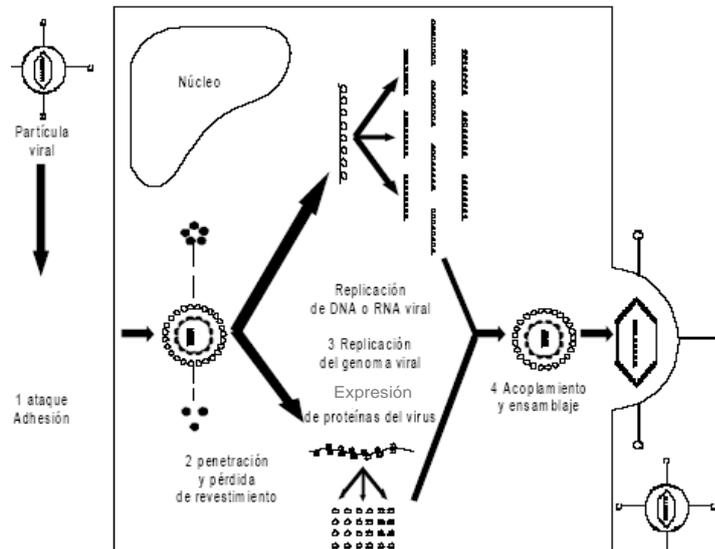


Figura 1. Pasos del ciclo vital de un virus que pueden ser blanco de acción para las drogas antivirales (Barreto *et al.*, 1998).

PASO 1. INHIBICION DE LA ADHESIÓN

La inhibición de las primeras etapas de la replicación viral puede lograrse mediante sustancias que imiten al receptor viral o compitan por el receptor celular (White y Fenner, 1994). Por ejemplo: los sialoligosacáridos que imitan al receptor de la hemaglutinina viral de Influenza A, bloqueando la adsorción de los viriones a la célula huésped.

Otro ejemplo son los polisacáridos sulfatados como el sulfato de dextrán que inhibe la unión del HIV a su receptor celular, la proteína CD4 (Dalglish *et al.*, 1984).

PASO 2. INHIBICION DE LA PENETRACIÓN

La amantadina inhibe al virus de la influenza A en este paso. Sus efectos antivirales se ejecutan por interacción con la proteína de matriz viral M2; ésta forma canales iónicos por donde los protones atraviesan la envoltura del virus para liberar la nucleocápside viral, bloqueando esta transferencia de protones mediadas por M2 se inhibe así la pérdida de revestimiento viral (Davies *et al.*, 1964).

Otros compuestos como el arildone, actúan exclusivamente en la pérdida del revestimiento, inhibiendo selectivamente la multiplicación de algunos enterovirus, rinovirus y herpesvirus “*in vitro*” (Goldsmith y Whitley, 1992).

PASO 3. INHIBICION DE LA DUPLICACIÓN DEL GENOMA VIRAL

La mayoría de las drogas antivirales efectivas que actúan en este nivel son análogas de los nucleósidos requeridos para la síntesis de nuevos DNA y RNA virales (Schaeffer *et al.*, 1978).

El aciclovir es un análogo de guanosina acíclico, inhibe la DNA polimerasa y la replicación del DNA viral, y causa una terminación prematura de la cadena de DNA viral (Gnam *et al.*, 1983).

El trifosfato de zidovudina inhibe la transcriptasa reversa del HIV, así como el crecimiento de la cadena del DNA viral. Debido a que es activado por enzimas de las células hospederas, produce también efectos indeseados en las células no infectadas, (Richman, 1992).

La ribavirina es un potente inhibidor competitivo de la enzima deshidrogenasa esencial para la síntesis de trifosfato de guanosina (Eriksson *et al.*, 1977). Su mayor efecto antiviral es la inhibición en la terminación del RNA mensajero viral, así disminuye la producción de proteínas virales (Hall *et al.*, 1985).

Recientemente se ha descubierto una nueva clase de análogos de nucleósidos con estructura de pirimidina bicíclica (BCNA) con actividad selectiva contra el virus varicela zoster (VVZ) (Balzarini y McGuigan, 2002).

Los interferones (IFN) son una familia de glucoproteínas producidas por el huésped, como parte de su defensa natural contra las infecciones. Son citoquinas con propiedades complejas de tipo inmunomoduladores, antineoplásicas y antivirales. Su actividad antiviral es de forma indirecta, primero por unión a receptores celulares y luego, al inducir la producción de enzimas intercelulares. Esto interrumpe la multiplicación viral por el bloqueo total de la síntesis de proteínas (Goldstein y Lazzlo, 1988).

PASOS 4 Y 5. INHIBICION DE LA MORFOGENESIS Y LA LIBERACIÓN

Los inhibidores de proteasa (IP) evitan que el HIV inhiba la actividad de corte de la proteína de la proteasa del virus; como resultado, no pueden madurar las proteínas del

HIV recién generadas, no se forman correctamente los virus nuevos y se puede controlar la infección (Mandell *et al.*, 1999).

La terapia antiviral ha entrado en una época de progreso con la posibilidad actual de tratar varias enfermedades virales. Sin embargo, todavía no existen tratamientos de baja toxicidad, para la mayor parte de las enfermedades de interés médico o veterinario producidas por virus. Por eso lo ideal sería buscar compuestos que tengan elevada eficacia antiviral, capaces de distinguir las funciones de la célula hospedera con las funciones virales específicas, para que tengan una mínima toxicidad para las células infectadas (Bean, 1992; Barreto *et al.*, 1998).

4.1.2. Agentes antivirales de origen natural

La mayoría de los fármacos que se utilizan tienen su origen en la naturaleza, siendo las plantas terrestres la principal fuente de estos compuestos. Sin embargo, el 70% de nuestro planeta está cubierto por los océanos; los organismos marinos con su gran diversidad y abundancia son fuentes potenciales de nuevos fármacos (Freile, 2001). En las últimas décadas, la química de los productos naturales de origen marino, en especial de algas, ha sido objeto de intensas investigaciones que han permitido descubrir nuevas sustancias con propiedades farmacológicas muy importantes (De Lara-Isassi *et al.*, 2005; Charzeddine y Fariñas, 2001).

4.1.2.1 Algas Marinas.

El término alga se aplica a los organismos de naturaleza vegetal, ya sean de agua dulce o agua salada, que no desarrollan flores como lo hacen las plantas vasculares terrestres y acuáticas. La mayoría de las algas son capaces de elaborar sustancias orgánicas a partir del dióxido de carbono (CO₂) y de sustancias inorgánicas disueltas en el agua. Las sales y otras sustancias nutritivas pueden ingresar por cualquier punto de su cuerpo (Raven *et al.*, 2001).

Las algas marinas bentónicas, son ampliamente distribuidas en el océano y son económicamente importantes como alimento, fertilizante, fuente de agar y de yodo (Schaeffer y Krylov, 2000). Las algas marinas pertenecen a cuatro divisiones. Estas se diferencian principalmente por el tipo de pigmento predominante (*tabla 1*).

	<u>Algas azules</u>	<u>Algas rojas</u>	<u>Algas Pardas</u>
<i>Acrosiphonales</i>	<i>Oscillatoria</i> <i>Corallinae</i>	<i>Ahnfeldtiales</i>	<i>Chordariales</i>
<i>Chlorococcales</i>	<i>Calothrix</i> <i>crustacea</i>	<i>Bangiales</i>	<i>Desmarestiales</i>
<i>Cladophorales</i>	<i>Choococcus</i> <i>turgidus</i>	<i>Ceramiales</i>	<i>Dictyosiphonales</i>
<i>Prasinolvocales</i>	<i>Microcoleus</i> <i>tenerrimus</i>	<i>Corallinales</i>	<i>Dictyotales</i>
<i>Siphonales</i>		<i>Cryptonemiales</i>	<i>Durvilleales</i>
<i>Ulotrichales</i>		<i>Gigartinales</i>	<i>Ectocarpales</i>
<i>Ulvales</i>		<i>Gracilariales</i>	<i>Sporochnale</i>
		<i>Nemalionales</i>	
		<i>Rhodymeniales</i>	

Tabla 1. Tipos de Algas marinas

Investigaciones químicas han demostrado que estos organismos producen una amplia variedad de metabolitos secundarios biológicamente activos, con estructuras moleculares únicas, no encontradas en otros organismos, capaces de inhibir ciertas bacterias, virus y hongos (Carlucci *et al.*, 1997).

4.1.2.1.1 Algas Pardas. Las algas pardas (clase Phaeophycophyta) producen diferentes polisacáridos: los alginatos, los laminaranes y los fucoidánes (Ponce *et al.*, 2003). Estos compuestos evitan la desecación y además tienen un papel similar al de la celulosa en las plantas, confiriendo a las algas una estructura más flexible que les permite soportar las fuerzas y movimientos a los que se encuentran sometidas por la acción de las corrientes de agua (Lapasin y Pricl, 1995).

Reportes recientes muestran que los polisacáridos aislados de las algas pardas poseen significativas actividades antiinflamatoria, antitrombótica y antiviral. A los fucoidánes que contienen cantidades variables de L-fucosa se les atribuye la mayor actividad biológica (Duarte *et al.*, 2001)

4.1.2.1.2 *Cladosiphon okamuranus*. Es un alga parda que crece entre la Isla de Amami-ohshima y la Isla Okinawa en Japón (Tohma, 1988). El fucoidán de esta alga está compuesto de L-fucosa, D-xilosa, ácido urónico y ácido sulfúrico en una proporción molar de 3.9:0.1:1.0:1.0 (Tako *et al.*, 2000). Mientras que según Nagaoka *et al.* (1999), el fucoidán de dicha alga contiene fucosa, ácido glucorónico y sulfatos en una proporción molar de 6.1: 1.0: 2.9.

4.1.2.2 Polisacáridos Sulfatados.

Numerosos estudios indican que los polianiones sulfatados, principalmente la heparina, el dextrán sulfato, la lambda y kappa carragenan xilogalactanos, xilomananos y el fucoidán, poseen potente actividad terapéutica contra enfermedades virales, así como otras propiedades anticoagulante y antitumoral (Chapman y Chapman, 1980).

4.1.2.2.1 Actividad Antiviral. El mecanismo de acción antiviral de los polisacáridos sulfatados es principalmente inhibiendo la entrada de virus envueltos, como Herpesvirus (HSV), dentro de la célula hospedera, por competencia por los receptores de la superficie celular (Luscher-Mattli, 2000; Schaeffer y Krylov, 2000; Witvrouw *et al.*, 1997). Hay un número de receptores, incluyendo el receptor heparin sulfato, expresados en varios tipos de células, los cuales proveen los puntos de entrada para el virus Herpes. La actividad antiviral, en parte, es debida a la similitud de los polianiones sulfatados a las moléculas heparin sulfato de los mamíferos (Campadelli-Fiume *et al.*, 2000).

Como regla general, la actividad antiviral de los polisacáridos sulfatados incrementa con el peso molecular (10-100 kDa) y el grado de sulfatación (Witvrouw *et al.*, 1997). Las propiedades antivirales aumentan con la cantidad de sulfato por unidad de disacárido (Carlucci *et al.*, 1997). Esto se debe a que estos grupos sulfatos proporcionan la carga negativa permitiendo mejor efecto antiviral (Mastromarino *et al.*, 1997).

El polisacárido sulfatado derivado de *Spirulina platensis* (calciospirulán, Ca-Sp) presentó actividad contra el virus herpes simple tipo 1 (HSV-1) y el HIV. Se comprobó que el reemplazo del ion Ca^{+2} en la molécula del Ca-Sp por los cationes sodio y potasio, mantenían la actividad viral, al contrario de los metales trivalentes, que la redujeron. Así mismo la depolimerización del complejo con sodio disminuyó dicha actividad (Lee *et al.*, 2004).

Las fracciones de *Undaria* también provocaron una estimulación inmune “*in vitro*” e “*in vivo*”, y esto hace que incremente su actividad antiviral. Se observó que ingiriendo GFS se incrementó el índice de curación de los pacientes con infecciones activas del virus Herpes, y los pacientes en estado latente llegaron a ser asintomáticos. Las moléculas sulfatadas se encontraron en plasma después de la ingestión oral, estas macromoléculas pasan a través del intestino hacia el plasma y hacia la linfa por el sistema linfático del intestino, donde pueden actuar sobre el sistema inmunológico (Cooper *et al.*, 2002).

Los polisacáridos sulfatados, dextrán sulfato y heparina fueron potentes inhibidores de HIV-1 evaluados en células MT-4. La concentración efectiva al 50% (CE₅₀) fue de 9.1µg/ml para dextrán sulfato y de 7.0µg/ml para heparina, encontrando la concentración citotóxica al 50% (CC₅₀) a una concentración de 625µg/ml de cada compuesto. (Baba *et al.*, 1988).

Xilogalactanos y xilomananos de *Nothogenia fastigiata* mostraron actividad antiviral sobre diferentes cepas de HSV, a pesar de su bajo contenido de sulfato y una simple ramificación de xilosa (Kolender *et al.*, 1997).

4.1.2.3 Fucoidán.

4.1.2.3.1 Estructura y Composición. El fucoidán es un polisacárido sulfatado complejo extraído de la pared celular de muchas algas pardas; tiene una función en la organización de la pared celular del alga; probablemente puede estar involucrado en la unión cruzada de alginato y celulosa, y también se le asocia en la morfogénesis de las algas (Berteau y Mulloy, 2003).

Los fucoidanes también llamados fucoidines, fucanes o sulfatos de fucán (McNeely, 1959), son polisacáridos sulfatados lineales o con ramificaciones muy cortas; son de peso molecular disperso y dependiendo de la cantidad de L-fucosa presente en la molécula pueden clasificarse como Homofucanos, constituidos por más del 95% de L-fucosa o Heterofucanos, que además de L-fucosa, pueden contener D-xilosa, D-galactosa y ácido D-glucurónico (Duarte *et al.*, 2001). A los fucoidanes se les han atribuido varias actividades biológicas, como la antiviral y antiproliferativa; en esta última se ha observado que logra un efecto reversible (Riou *et al.*, 1996).

El fucoidán del alga parda *Cladosiphon okamuranus* presenta una estructura basada en un esqueleto de L-fucosa. La degradación Smith mostró un esqueleto lineal de

Mecanismo de Acción

Inhibición de la Adsorción

Competiendo por los receptores: inhibe la interacción del receptor viral de RSV (proteína G) a la L-selectina y annexin II (Malhotra *et al.*, 2003). Compete con heparán sulfato (superficie celular) para unirse a los virus de la diarrea viral bovina (Iqbal *et al.*, 2000). Inhibe la unión del virus HIV al receptor CD4: El fucoidán inhibió HIV por su afinidad hacia la célula blanco y no por el receptor gp120 del virus, ya que se enlazó a los linfocitos que expresaban CD4 e inhibió la unión de los anticuerpos monoclonales a los dominios de CD4 (Lynch *et al.*, 1994).

El fucoidán de *Sargassum polycystum* inhibe la adsorción del virus de la mancha blanca (WSSV) a las células del camarón, gracias al grado de sulfatación del fucoidán (7.7%) previniendo la infección (Chotigeat *et al.*, 2004). Además el fucoidán tiene efecto inmunoestimulante el cual incrementa la actividad fagocítica en los camarones (Sakai, 1999).

Un estudio reveló la inhibición de la replicación de ASFV (virus de la fiebre porcina africana) sólo cuando el fucoidán (MW 8000) estaba presente durante la adsorción del virus (García-Villalón y Gil-Fernández, 1991).

Inhibición de la fusión

El fucoidán sulfatado proveniente de *Laminaria abyssalis*, inhibió la formación del sincicio producido por HTLV-1 en células HeLa, cuando el fucoidán fue agregado en las primeras dos horas después de la infección (Romanos *et al.*, 2002).

El fucoidán puede bloquear la formación de células gigantes (sincicios) entre células infectadas con HIV-1 y células sin infectar CD4 positivas, ya que la formación de sincicios depende de la interacción de gp120 con CD4 (Nakashima *et al.*, 1987).

Inhibición de la biosíntesis del virus

El fucoidán sulfato Hor-1, extraído de *Sargassum horneri* mediante un proceso simple de extracción con agua caliente, constituido por a-L-fucosa con sodio, sulfato y un poco de ácido urónico, resultó ser un potente inhibidor de la replicación de HSV-1, obteniendo un índice de selectividad (IS) de 7100 cuando se agregó inmediatamente después de 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 HIV (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 y Krylov, 2001).

4.1.2.3.2.1 Dosis efectivas “*in vitro*”. Estudios en células demostraron que el fucoidán es un potente y selectivo inhibidor de la replicación de varios virus envueltos a dosis por debajo de las dosis citotóxicas, lo que asegura un índice de selectividad (o índice terapéutico) alto.

Se encontraron concentraciones efectivas al 50% (CE₅₀) de 2.5, 2.6, 1.5 y 15 µg/ml del fucoidán sobre la replicación viral de HSV-1, HSV-2, HCMV e influenza A respectivamente, cuando el fucoidán fue agregado en el mismo tiempo de la infección viral. Cuando se agregó el fucoidán en el medio después de la infección viral, la actividad antiviral fue menor (14, 5.1, 16 y 55 µg/ml respectivamente). Mientras que la concentración citotóxica al 50% (CC₅₀) del fucoidán fue mayor de 2000 µg/ml en las líneas celulares: VERO (riñón de mono verde africano), HEL (eritroleucemia humana) y MDCK (epitelio intestinal de perro) (Lee *et al.*, 2004).

El fucoidán a una concentración de 15µg/mL inhibió la infección de RSV (*paramyxoviridae*) en cultivo celular Hep2 uniéndose al receptor L-selectina de la célula hospedera (Malhotra *et al.*, 2003). A una concentración de 0.2µg/mL de fucoidán se encontró inhibición de los arenavirus (Baba *et al.*, 1988; Andrei y Clerq, 1990).

Se evaluó “*in vitro*” el efecto inhibitorio del fucoidán en la replicación de ASFV (virus de la fiebre porcina africana). Basado en el rango de CC₅₀ (3000µg/ml) y de la IC₅₀ (300µg/ml), el fucoidán presentó un índice de selectividad de 10 (García y Gil, 1991).

Se estudió el efecto antiviral del fucano extraído de *Laminaria abyssalis* en cultivo de células HeLa con el virus linfotrófico T humano -1 (HTLV-1) a una concentración de 100 µg/ml del fucano se obtuvo una inhibición de casi 100% de la formación del sincicios. Y a una concentración de 25 µg/mL se obtuvo una inhibición de casi 95% (Romanos *et al.*, 2002).

4.1.2.3.2.2 Dosis Efectivas “*in vivo*”. En camarones (*Penaeus japonicus*) la eficacia de la administración oral de fucoidán, extraído del alga café *Cladosiphon okamuranus*, a concentraciones de 60 y 100 mg de fucoidán semipuro/ kg de camarón por día, en el control del síndrome de mancha blanca (WSS), “*in vivo*” por inmersión

con el virus, presentando un 77% de supervivencia con un 100% de mortalidad en el control (Takahashi *et al.*, 1998).

4.1.2.3.3 Otras Propiedades Bioactivas. Los fucoidanes son moduladores de la coagulación, ya que son análogos de la heparina, con la gran ventaja de que al ser de origen vegetal no existe el riesgo de contaminación de virus animales o priones (Muñoz-Ochoa *et al.*, 2005).

El fucoidán de *F. vesiculosus* presenta una actividad anticoagulante y antitrombótica por inhibición de la trombina interactuando con el cofactor II de la heparina y en menor grado con la anti-trombina III (Mourao y Pereira, 1999).

El fucoidán extraído de *Ascophyllum nodosum* previene la trombosis arterial y mejora la circulación en modelos animales (Colliec-Jouault1, 2003). El fucoidán extraído de *Ascophyllum nodosum* presenta actividad antitumoral en ensayos "in vivo" en modelo murino sin efecto citotóxico (Riou *et al.*, 1996). El fucoidán es un agente antiangiogénico al suprimir la neovascularización inducida por las células de Sarcoma 180, e inhibir la acción de VEGF 165 (Koyanagi *et al.*, 2003).

Shibata *et al.* (2000) demostraron que el fucoidán de *Cladosiphon okamuranus* bloqueó la adhesión de *Helicobacter pylori* a una línea celular gástrica humana.

El fucoidán tiene efecto antimalaria "in vitro", inhibiendo la invasión de *Plasmodium falciparum* a los eritrocitos. (Clark *et al.*, 1997) *Toxoplasma gondii* también es afectado por el fucoidán, en este caso bajas concentraciones pueden incrementar la infección y altas concentraciones tiene efecto inhibitorio en cultivo de fibroblastos (Ortega-Barria y Boothoyd, 1999).

4.1.2.4 Recursos Algales de México

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* (tabla 2); cabe mencionar que todas las especies mencionadas se destinan como materias primas para la producción de ficocoloides (alginatos, agar y carragenanos) (Pacheco *et al.*, 2000).

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 genero *Caulerpa*, han mostrado tener actividad contra bacterias Gram + (Freile, 2001).

Especie	Uso	Destino	Producción
Algas Pardas			
<i>Macrocystis pyrifera</i>	Alginatos y Harina para alimento en Maricultivo	Exportación y consumo	80,000 ton frescas
<i>Egregia sp</i>	No aprovechado		No estimado
<i>Eisenia sp</i>	No aprovechado		No estimado
<i>Sargassum sp</i>	No aprovechado		No estimado
Algas Rojas			
<i>Gelidium Robustum</i>	Producción de agar	Uso local	1500 ton. Secas
<i>Chondracanthus canaliculatus</i> (Gigartina)	Producción de carrageninas	Exportación	1500 ton. Secas
<i>Chondracantus pectinatus</i>	Producción de carrageninas no aprovechado		325 ton. Secas
<i>Eucheuma uncinatum</i>	Producción de carrageninas no aprovechado		65 ton. Secas
<i>Gracilariopsis lemaneiformis</i>	Producción de agar	Exportación	5000 ton. Secas
<i>Gracilaria pacífica</i>	Producción de agar		No estimado

Tabla 2. Especies Algales presentes en Baja California y sus usos.

4.2. Control de Enfermedades en la Industria Avícola

4.2.1 Producción Avícola

La avicultura es la rama de la ganadería nacional que se encuentra en un nivel tecnológico desarrollado y favorable, ya que esta actividad ha incorporado los más recientes avances en genética y alimentación en los últimos 50 años. Los productos

avícolas como la carne de pollo y el huevo, representan una fuente de proteína de origen animal de excelente calidad nutricional y barata. Además la industria avícola en México es una fuente importante para la generación de más de 950 mil empleos, tanto directos como indirectos, principalmente en el medio rural (UNA, 2005).

La avicultura mexicana en 2005, aportó el 0.76% en el PIB total, el 16.57% en el PIB agropecuario y el 44.17% en el PIB pecuario. En el 2005 se produjeron cerca de 2.5 millones de toneladas de carne de pollo, muy por encima de los demás cárnicos, la producción de huevo fue de 2.3 millones de toneladas y la de pavo 13,840 toneladas. El sector avícola mexicano participa con el 63.2% de la producción pecuaria; 33% aporta la producción de pollo, 30.1% la producción de huevo y 0.20% la producción de pavo. De 1994 al 2005 el consumo de insumos agrícolas ha crecido a un ritmo anual de 3.9% y cabe destacar que la avicultura es la principal industria transformadora de proteína vegetal en proteína animal. Para el presente año la avicultura generará 1, 072,000 empleos, de los cuales 178,000 son directos y 892,000 indirectos.

México cuenta con una parvada de más de 130 millones de gallinas ponedoras, 243 millones de pollos al ciclo y 865 mil pavos por ciclo. La producción de pollo en México, durante el periodo de 1994 a 2005 ha aumentado a un ritmo de crecimiento anual del 5.5%. El 90% de la producción de carne de pollo en México durante 2005, se concentró en 10 estados, localizados principalmente en el centro del país (figura 3). En México el consumo per-cápita de pollo ha aumentado de 19.9 kg en 2000 a 24.2kg durante 2005, lo que representa un incremento del 21.6% (SENASICA, 2005).

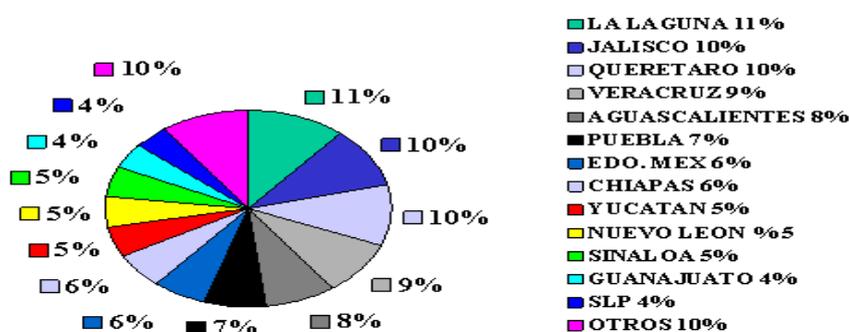


Figura 3. Principales estados de México productores de pollo (SENASICA, 2005).

La producción de huevo durante la última década creció a un ritmo anual de 4.1%. El 97% de la producción de huevo en México durante 2005, se produjo en 7 Estados, localizados cerca de los centros de consumo, Puebla, Jalisco, Sonora y la Región Lagunera; quienes siguen siendo las principales zonas productoras desde hace varios años (figura 4). México es el principal consumidor de huevo fresco en el mundo. El 90% de la producción de carne de pavo en México se localiza en los estados de Sonora (40%), Chihuahua (35%) y Yucatán (20%) y en otros estados tan solo el 5%. La producción de pavo en la actualidad es de 13,840 toneladas anuales, con una tasa media de crecimiento anual de 1994-2005 del 6.4% (SENASICA, 2005).

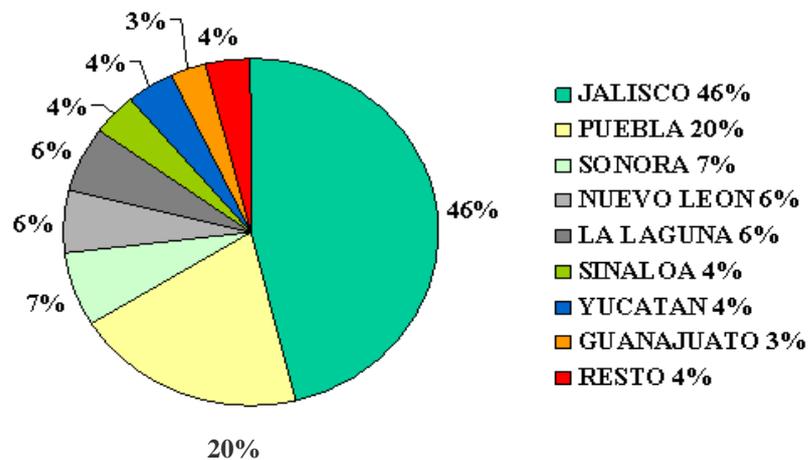


Figura 4. Principales estados productores de huevo (SENASICA, 2005).

4.2.2 Virus Envueltos de Importancia Aviar

4.2.2.1 Influenza Aviar (Orthomixovirus).

La mayoría de las infecciones con el virus de la Influenza Aviar (con los subtipos H1 a H16) son subclínicos o producen una moderada enfermedad, mientras que pocos aislamientos de los subtipos H5 y H7 inducen una enfermedad altamente severa y fatal denominada Influenza Aviar de alta patogenicidad, que históricamente fue denominada Peste Aviar. El virus de la Influenza Aviar pertenece a la Familia: Orthomyxoviridae, género: Influenza virus A. Este es un virus envuelto RNA de cadena simple, de sentido negativo, cuyo genoma está compuesto por 8 genes segmentados que codifican para 10 proteínas. Dentro de estas proteínas codificadas, dos glicoproteínas son utilizadas para el estudio epidemiológico del virus: La Hemoaglutinina y la

Neuraminidasa. Están reportados 16 subtipos de hemoaglutininas (H1 a H16) y 9 neuraminidasas (N1 a N9) (Menno y Tran, 2006).

Los primeros casos de Influenza Aviar en humanos se dieron originalmente en las regiones de Asia en 1997, donde se identificó un Virus de Influenza Aviar subtipo H5N1 de alta patogenicidad para las aves (Suárez y Schultz-Cherry, 2000; Swayne y King, 2003)

La vacunación es obligatoria en estados en fase de control, obligatoria en erradicación o granja libre. Aunque existe mucho riesgo en vacunar a animales enfermos en período de incubación, por lo tanto el sacrificio de las aves infectadas sigue siendo la recomendación cuando se detecta la enfermedad (NOM 44-ZOO-1995).

4.2.2.2 Laringotraqueítis (Herpesvirus).

La laringotraqueítis es una enfermedad aguda en pollos; se caracteriza por signos de depresión respiratoria, boqueo y expectoración sanguinolenta. Es causada por el LTV (virus de la laringotraqueítis infecciosa aviar), un virus envuelto DNA de doble cadena y pertenece a la familia herpesviridae. Esta enfermedad provoca pérdidas en la producción de huevo y alta mortalidad. Aunque las actuales vacunas (con virus vivos modificados) ofrecen un buen nivel de protección, las cepas víricas empleadas pueden también provocar infecciones latentes, así como la aparición de la enfermedad (Bagust *et al.*, 2000).

4.2.2.3 Enfermedad de Newcastle.

La enfermedad de Newcastle continúa siendo una de las enfermedades aviarias más importantes. Es una de las patologías más temidas por los productores avícolas, debido a la alta morbilidad y mortalidad que ocasiona, generando, en consecuencia, cuantiosas pérdidas económicas y menor disponibilidad de una de las proteínas de origen animal con alto valor nutritivo y de fácil adquisición. La enfermedad es capaz de afectar a pollos, pavos, aves silvestres en cautiverio y, ocasionalmente, a los humanos (Farsang *et al.*, 2003). Es causada por el NDV (virus de la enfermedad de Newcastle), un virus envuelto, RNA no segmentado de cadena sencilla (*Paramyxovirus*

aviar serotipo-1 APMV-1) de la familia *Paramyxoviridae*, genero *Avulavirus* y orden *Mononegavirale* (Alexander, 2000).

4.2.2.3.1 Características del Virus. El genoma consta de 15,186 nucleótidos (Peeters *et al.*, 1999) y codifica 6 proteínas estructurales: proteína de la nucleocápside (NP), fosfoproteína (P), proteína de la matriz (M), proteína F, hemaglutinina (HN), la polimerasa (L) (figura 5) y dos proteínas adicionales V y W, las cuales se derivan del gen P (Wilde *et al.*, 1986). La envoltura del NDV presenta tres tipos de proteínas: las glicoproteínas HN y F son de transmembrana con dominios activos en el exterior del virión y la proteína M asociada a la parte interna de la membrana (Steward *et al.*, 1993; Alexander, 2000) (figura 5).

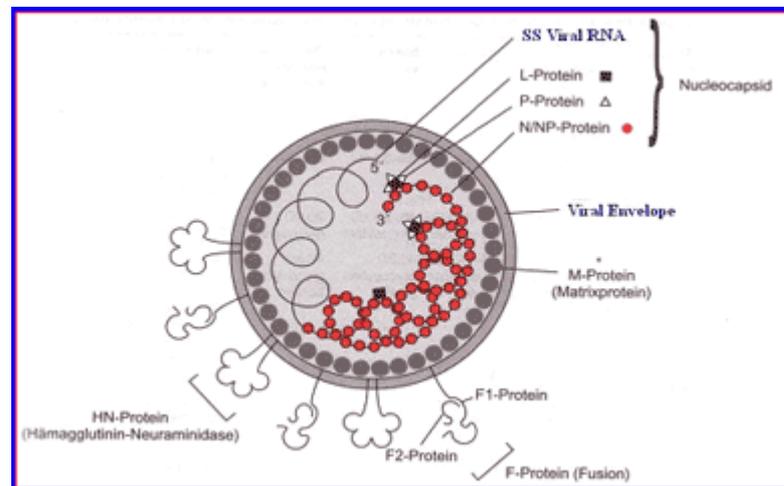


Figura 5. Estructura del NDV

La glicoproteína HN de los paramixovirus es responsable de reconocer el receptor y de la adhesión a las células blanco de la infección. La HN es una proteína multifuncional que presenta actividad hemaglutinante, neuraminidasa y promotora de fusión de las membranas viral y celular (Ebata *et al.*, 1991).

El análisis de la glicoproteína HN, purificada mediante centrifugación diferencial en gradientes de sacarosa y cromatografía de intercambio iónico, permitió determinar que está compuesta por 50.5, 13.3 y 13.6% de aminoácidos no polares, polares sin carga y polares cargados. Su fracción glicosídica está constituida por manosa, galactosa, N-acetilgalactosamina y N-acetilglucosamina en proporciones de 3:3:2:1 respectivamente, así como trazas de ácido N-acetilneuramínico (Ray y Compans, 1990) lo que muestra, que la proporción y los constituyentes típicos de una proteína N-glicosilada, coinciden

con las predicciones de composición peptídica y de N-glicosilación basadas en la secuencia genética. No obstante, la proporción encontrada de N-acetilgalactosamina sugiere que esta proteína también podría estar O-glicosilada (Iorio *et al.*, 1986).

En relación a su actividad, la glicoproteína HN aglutina eritrocitos de una gran variedad de especies animales, incluyendo cerdo, carnero, vaca, perro, conejo, ratón, rata, hámster, cobayo, pollo y humano tipo O (Hu *et al.*, 1992). Esto se debe al reconocimiento específico de ácidos siálicos expresados en las superficies de estos eritrocitos. Al respecto, han demostrado, en ensayos de competencia con diversos azúcares, que la proteína HN posee mayor afinidad por residuos de ácido N-acetilneuramínico unidos por enlace glicosídico alfa 2-3 a galactosa (NeuAca2, 3Gal) (McGinnes *et al.*, 2002).

La proteína HN posee también actividad neuraminidasa o sialidasa que le permite hidrolizar los residuos de ácido siálico de los receptores celulares; es muy estable en un rango de temperatura de 30-55 °C (Kemble *et al.*, 1993).

La glicoproteína F es muy conservada. Esta proteína tiene un dominio altamente hidrofóbico que participa en la fusión de la membrana celular y la envoltura viral, lo que permite que el virus se introduzca al citoplasma y que se difunda de célula a célula sin exponerse al medio extracelular (Zhu *et al.*, 2005). Esta característica origina la formación de células gigantes multinucleadas (sincicios) apreciables en tejidos y en cultivos celulares infectados por esta familia (paramixovirus) (Morrison y Porther, 1991; Panda *et al.*, 2004).

La proteína F es sintetizada como un precursor inactivo llamado F₀, que por acción de una proteasa celular del tipo de la tripsina da origen a dos polipéptidos (F₁ y F₂) unidos por un enlace disulfuro que constituyen la proteína activa (White, 1990). El procesamiento proteolítico expone un segmento altamente hidrofóbico en el extremo N-terminal de la subunidad F₁, implicado directamente en el ataque inicial a la membrana celular para dar lugar a la fusión (Panda *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2005).

Se ha propuesto que la proteína F debe ser activada de alguna forma por la HN para que el evento de fusión de membranas se desencadene. En estos eventos están relacionados dominios cercanos a la envoltura viral, donde se encuentran motivos de unión proteína-proteína, al parecer, durante la interacción con los receptores celulares la

HN sufre un cambio de conformación que permite contactar un dominio de la proteína F, que a su vez expone el péptido hidrofóbico involucrado directamente en el ataque a la membrana celular, para iniciar de esta forma la introducción a la célula hospedera (Gravel y Morrison, 2003). Esta interacción F-HN es específica de especie viral, ya que se ha observado que la coexpresión en cultivos celulares de proteínas de otros paramixovirus no producen fusión celular (Deng *et al.*, 1995; Panda *et al.*, 2004).

La proteína M se localiza en la parte interna de la envoltura viral, está constituida por 369 aminoácidos, gran parte de los cuales son de carácter básico (Berg *et al.*, 1991). Debido a su carga neta positiva tiene gran afinidad por la NP, característica importante que le permite intervenir en el ensamble de la partícula viral con un reducido gasto energético, interactuando con las nucleocápsides en las zonas de la membrana celular donde se encuentran ancladas las glicoproteínas virales (Sergel *et al.*, 1993). La proteína M es importante en el mantenimiento de la estructura del virión, ya que forma una especie de puente entre la nucleocápside y la envoltura viral; además, se ha propuesto que juega un papel regulador de la transcripción, probablemente por obstaculizar la acción de la polimerasa sobre el genoma viral durante el ensamble de viriones (Lamb y Kolakofsky, 1996; Shihmanter *et al.*, 2005).

La nucleoproteína (NP) forma parte integral de la nucleocápside y rodea al RNA genómico en todo su contorno helicoidal. Su función es proporcionar una conformación adecuada a la cadena de RNA genómico durante su transcripción y replicación. La unión de la NP al genoma es de una afinidad muy alta y no se separan durante la replicación ni la transcripción, así que, a diferencia de los virus de RNA positivo, el genoma de los virus de RNA negativo nunca se encuentra desnudo (Kolakofsky *et al.*, 1998).

A la nucleocápside se asocian aproximadamente cincuenta complejos con actividad de polimerasa que se encargan de la transcripción y replicación del genoma viral. Cada complejo está formado por tres unidades de la proteína P y una de la proteína L, aunque también se puede presentar el mismo número de complejos de proteína P sin la proteína L. El gen P puede dar origen a cuatro productos: P, V, I y C. La proteína V, de 249 aminoácidos, es codificada por una copia exacta del gen P, la adición de dos guanidinas no codificadas, entre las posiciones 586 a 591 de la secuencia genómica, permite que el marco de lectura se alargue para dar lugar a la expresión de la proteína P, de 404

aminoácidos (Vagnozzi y Carrillo, 2006). El marco de lectura que da origen a la proteína I se forma de manera similar al de la proteína P, sólo que en lugar de añadir dos guanidinas se añade una, lo que ocasiona que el marco de lectura termine antes que cualquiera de los otros dos, originando un péptido de 174 aminoácidos. Por último, la proteína C (126 aminoácidos) se codifica en un marco de lectura más pequeño contenido dentro de los tres anteriores. De esta manera se puede observar que las proteínas V, P e I poseen un dominio idéntico en el extremo amino de 168 aminoácidos (Berg *et al.*, 1991; Vagnozzi y Carrillo, 2006).

Datos experimentales muestran que las proteínas V y C de los paramixovirus están involucradas en la regulación de la replicación y la transcripción viral y en la inhibición de las cascadas de activación del interferón en la célula hospedera como respuesta a la infección. La proteína L es la más voluminosa del virión y es el componente catalítico de la RNA polimerasa (Svenda *et al.*, 1997).

4.2.2.3.2 Ciclo Replicativo. La partícula viral se adsorbe en la membrana de la célula hospedera por medio de la proteína HN, que reconoce como receptor específico el oligosacárido NeuAca2, 3Gal. Un cambio conformacional de la HN activa la proteína F, la cual lleva a cabo la fusión de las membranas celular y viral, provocando que el RNA viral sea liberado en el citoplasma (Schneider-Schaulies, 2000). En este punto comienza, por un lado, la síntesis de RNA antigenómico (cadena complementaria al genoma), la cual da origen a genomas nuevos, y por otro lado, a la producción de RNA mensajero, que codifica para las proteínas virales (Panda *et al.*, 2004). Los productos de la traducción se dirigen al sitio de ensamble, las proteínas NP, P y L son acopladas al RNA recién sintetizado y la proteína M se ubica en la parte interna de la membrana celular (Errington, 1996). Las glicoproteínas (HN y F), sintetizadas en retículo endoplásmico, son modificadas en aparato de Golgi y posteriormente insertadas en la membrana citoplásmica, en contacto íntimo con la proteína M. La afinidad de las proteínas del genoma (NP, P y L) con la proteína de matriz y de ésta con las glicoproteínas es determinante para el ensamble del virión, que es liberado de la célula por exocitosis (Shihmanter *et al.*, 2005) (*figura 6*)

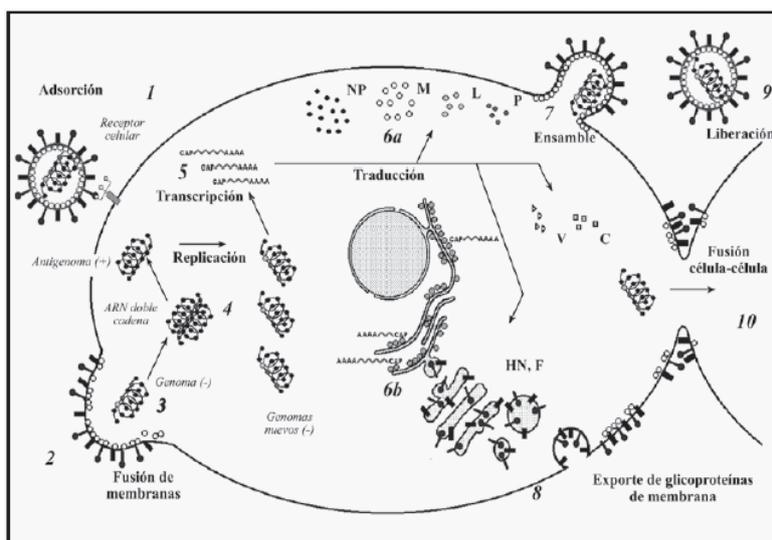


Figura 6. Ciclo de NDV

Es característico en los paramixovirus que además de la formación de viriones, los virus pueden infectar las células inmediatamente vecinas a través de la fusión membranal célula-célula, debido a la expresión de las proteínas virales en la membrana de la célula hospedera, lo cual le permite dispersarse sin necesidad de salir al medio extracelular (Scheid y Chopin, 1974; Lamb, 1993; Zhu *et al.*, 2005).

4.2.2.3.3. Signos Clínicos. En base a la patogénesis la virulencia y los signos clínicos, la enfermedad se categoriza en diferentes patotipos: velogénico viserotrópico, velogénico neurotrópico, mesogénico, lentogénico y entérico asintomático (Beard y Hanson, 1984; Seal *et al.*, 1995).

La ENC (enfermedad de Newcastle) es probablemente una de las enfermedades más infecciosas de las aves de corral en todo el mundo. ENC (patotipos velogénico, viserotrópico y neurotrópico) es tan virulenta que muchas aves mueren sin presentar ningún síntoma clínico, y aves sin vacunar puede presentar un 100 por ciento de mortalidad. La Enfermedad de Newcastle exótica puede infectar y causar la muerte incluso en aves de corral vacunadas (Alexander, 2001).

La ENC afecta los sistemas respiratorio, nervioso y digestivo. El período de incubación de la enfermedad oscila entre 2 y 15 días. Un ave infectada puede mostrar los siguientes síntomas: Respiratorios: estornudos, jadeos, secreción nasal, estertores;

Digestivos: diarrea líquida verdosa; Nerviosos: depresión, temblores musculares, alas caídas, tuercen la cabeza y el cuello, dan vueltas en círculos, parálisis completa, disminución parcial a total de la producción de huevos, producción de huevos de cáscara delgada. Inflamación de los tejidos alrededor de los ojos y en el cuello y muerte súbita (McFerran y McCracken, 1988; Alexander, 2000) (figura 7).



Figura 7 Ave con la Enfermedad de Newcastle

4.2.2.3.4 Modo de Propagación de la Enfermedad de Newcastle (ENC). La ENC se propaga a través del contacto directo entre aves sanas y de las secreciones corporales de las aves infectadas. La enfermedad se transmite a través de los excrementos y las secreciones de la nariz, boca, y ojos de las aves infectadas. La ENC se propaga rápidamente entre las aves mantenidas en confinamiento, como los pollos criados comercialmente (Villegas 1998; Alexander, 2001).

En las secreciones corporales de las aves se encuentran altas concentraciones del virus Newcastle. Por lo tanto, la enfermedad se puede propagar fácilmente por medios mecánicos. El material portador de virus se puede recoger en zapatos y ropa y transportar desde una parvada infectada a otra sana. La enfermedad se propaga frecuentemente a través de cuadrillas de vacunación y recorte de pico, acarreadores de estiércol, personal de entrega de alimento, compradores de aves de corral, propietarios y empleados de las granjas avícolas (Alexander, 1997).

El virus Newcastle puede sobrevivir varias semanas en un entorno cálido y húmedo sobre plumas de aves, estiércol y otros materiales. Puede sobrevivir indefinidamente en material congelado. Sin embargo, el virus se destruye rápidamente por deshidratación y con los rayos ultravioletas de la luz solar (Gohmn *et al.*, 2000).

Las aves de contrabando adoptadas como mascotas, especialmente los papagayos amazónicos de América Latina, plantean un gran riesgo de introducción de la Newcastle

exótica en las parvadas de aves de corral de los Estados Unidos. Los papagayos amazónicos que son portadores de la enfermedad, pero que no muestran síntomas, son capaces de propagar el virus ENC durante más de 400 días (Alexander, 2000).

4.2.2.3.5 Huéspedes. Los huéspedes pueden ser muchas especies de aves tanto domésticas como salvajes. Los índices de mortalidad y de morbilidad varían según las especies y en función de la cepa viral. Las gallinas son las aves de corral más susceptibles, los patos y los gansos son las menos susceptibles (Linchuan y Hong, 1998). Puede existir un estado portador en las psitacinas y en algunas otras aves salvajes (Kaleta y Baldauf, 1988).

4.2.2.3.6 Distribución geográfica. En la siguiente figura se muestra el status de NDV según reportes de la OIE (2005-2006) (figura 8). En México el último reporte de la enfermedad Newcastle fue en la Comarca Lagunera en el 2006.

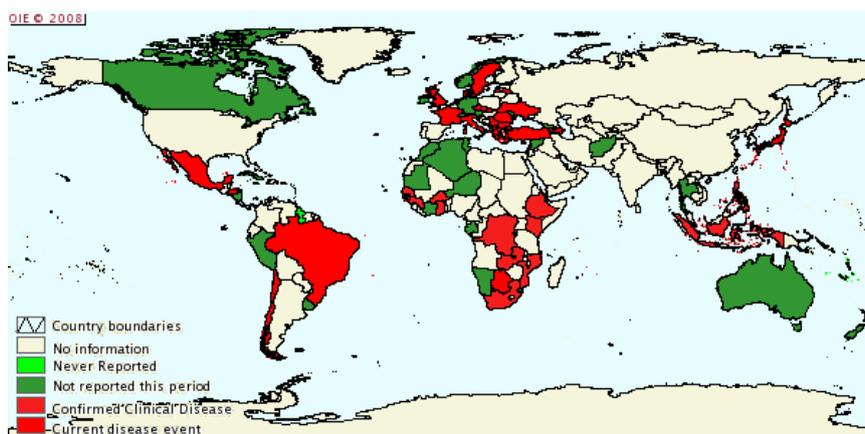


Figura 8. Brotes de NDV a nivel Mundial

4.2.2.3.7 Vacunación y sus Efectos Adversos. La enfermedad de Newcastle (ENC) ha sido controlada por muchos años con el uso de vacunas desarrolladas de virus lentogénicos-neurotrópicos conocidos como cepa Hitchner B1 y cepa La Sota. A pesar de su eficacia, estas presentan limitaciones. De cara a un desafío severo la clásica vacuna Hitchner B1 no es capaz de conferir una adecuada protección en el campo, particularmente en presencia de anticuerpos maternos. Además la cepa Hitchner B1 confiere inmunidad de duración limitada; de ahí que sea necesario efectuar revacunaciones (Meulemans, 1988).

Para superar estas limitaciones, se usan las cepas vacunales La Sota, que son más inmunogénicas. Sin embargo, la inmunización con estas vacunas puede causar severos trastornos sistémicos que resulten en un incremento en la mortalidad y reducción en el rendimiento. Su desventaja principal está en la reacción post-vacunal que genera, principalmente, cuando son aplicadas para inducir respuestas inmunes en aves de un día de edad (Villegas, 1998; Reynolds y Maraqa, 2000).

La principal razón de este efecto, es que estas cepas vacunales atenuadas conservan una patogenicidad residual y son capaces de diseminarse y persistir en el medio ambiente. Por lo tanto, si estas cepas vacunales, especialmente La Sota, son introducidas en granjas con aves de diferentes edades y estatus inmunológico, las aves de corta edad pueden desarrollar problemas clínicos o subclínicos que inducen pérdidas y requieren tratamiento sintomático (Hemmatzadeh y Alinejad, 2003).

Otra desventaja de estas cepas vacunales, es el tropismo que tienen sobre el sistema respiratorio, lo cual significa que el sitio principal de replicación del virus ocurre en la mucosa de la faringe, tráquea y bronquios primarios. Esta replicación conduce a un grado de lesión que va desde leve hasta severa dependiendo de factores ambientales como temperatura, humedad, densidad, amoníaco, etc. Si por una mala práctica de vacunación, estas cepas son puestas en contacto con zonas del sistema respiratorio más profundas tales como bronquios secundarios, pulmón o sacos aéreos, entonces la reacción post-vacunal es de mayor gravedad (Alexander, 2000).

Por otra parte, microorganismos como *micoplasma* y *E. coli* aprovechan la situación para inducir lesiones en los tejidos y profundizan la complicación respiratoria. No sólo las consecuencias sanitarias son dramáticas en términos de aumento de mortalidad y signos clínicos, también retardan el crecimiento del ave y aumentan los costos por medicaciones infructuosas (Fenner *et al*, 1992).

La vacunación puede reducir la posibilidad de que las aves se infecten, pero una vez que una parvada se encuentra infectada, puede enmascarar los síntomas de la enfermedad. Vacunas vivas lentogénicas que contienen cepas de Newcastle tipo B1 o La Sota, son usadas universalmente en aquellas zonas donde las vacunas vivas están autorizadas (Alexander, 2000; Hemmatzadeh y Alinejad, 2003).

La única manera de erradicar la ENC de las aves de corral comerciales, hasta hoy, es destruyendo rápidamente todas las parvada infectadas e imponiendo una cuarentena estricta y programas de vacunación (Alexander, 2000) (*figura 9*).



Figura 9. Destrucción de la parvada

4.2.3 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).

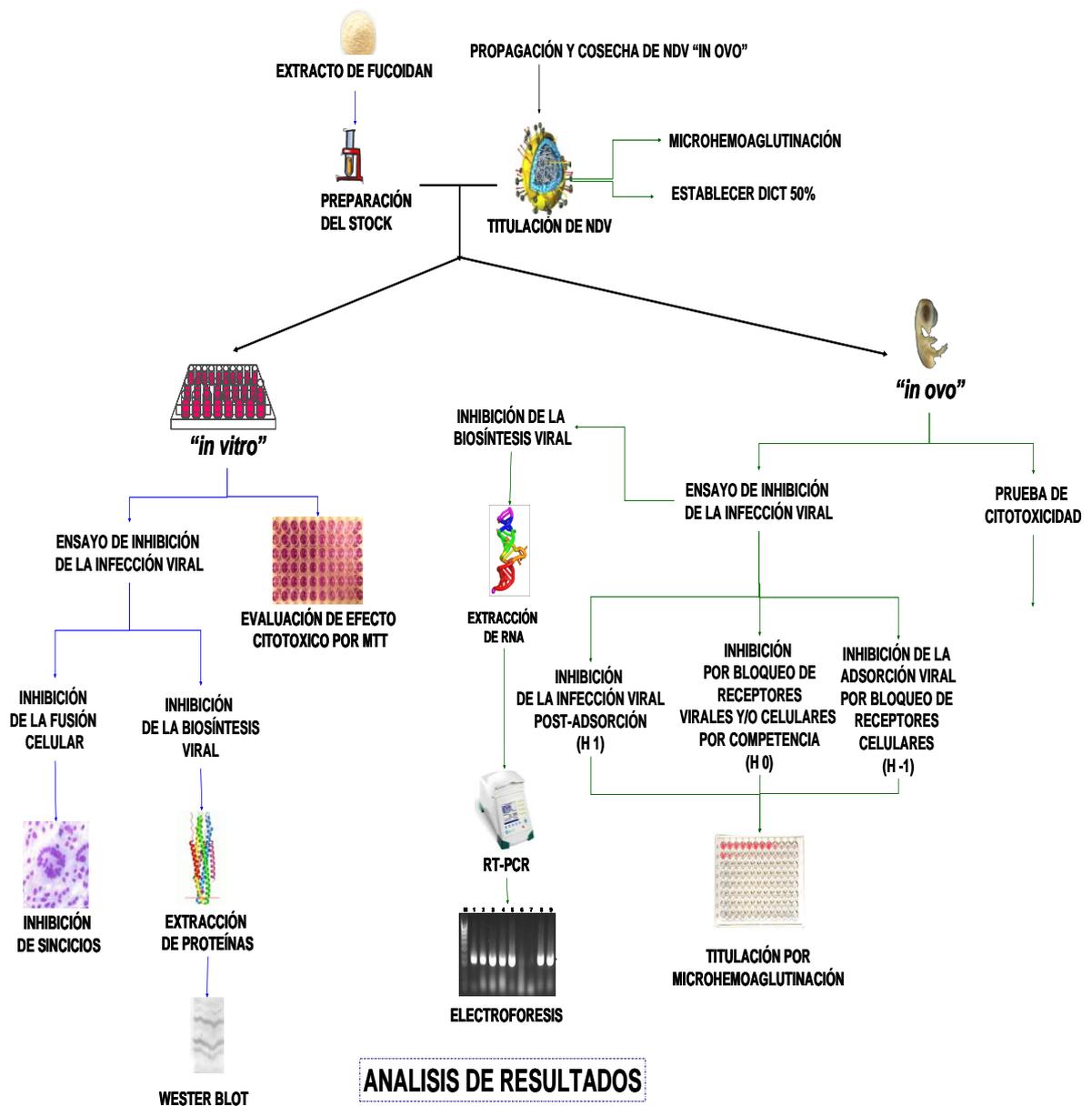
Se puede decir que los brotes de la enfermedad han disminuido considerablemente debido principalmente a los programas de vacunación que contemplan la aplicación de varias vacunas durante la vida del ave, pero, cuando se presentan fallas en los programas de vacunación, en los métodos de aplicación o el 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, 1997; Villegas, 2007).

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 (Villegas, 2007).

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. Asimismo que estén disponibles a bajo costo, para tener protegida a toda la población en su corto periodo de vida.

5. MÉTODOS

Diseño Experimental



5.1 Extracto de fucoidán

El extracto purificado de fucoidán fue obtenido por el grupo de la Dra. Elizabeth Cruz Suárez del Programa de Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Fue extraído del alga parda *Cladosiphon okamuranus* procedente de la costa Isla de Okinawa, Japón por la compañía Kadoya & Co (Lot A03012). Sus características se describen en la *tabla 3*.

5.1.1 Preparación del stock

El extracto de fucoidán se resuspendió en medio D-MEM/F12 para tener un stock de 2500 µg/mL, se esterilizó con un filtro de 0.45 µm. se conservó en congelación hasta su utilización. A partir del stock se hicieron diluciones en medio D-MEM/F12 para obtener las concentraciones seleccionadas para cada ensayo.

Características	Especificaciones	Análisis	Método de medición
Apariencia	Polvo café	---	Inspección visual
Olor y sabor	Olor a alga ligeramente, Sin otro olor ni sabor	---	Inspección Física
Pérdida al desecarse	Menos del 10%	6.90%	Secado por calor
Contenido de Fucoidán	Más del 80%	90.4%	Acido sulfúrico
Ph	5.0-6.0 (1.0% de solución)	5.4	Electrodo en vidrio
Peso molecular	Más de 10000	92.1 kD	HPLC
Bacteria coliforme	Negativo	---	Filme simple/fácil
Recuento de aeróbicos en placa	Menos de 1000 cfu/g	---	Filme simple/fácil
Moho y levadura	Menos de 300cfu/g	---	Filme simple/fácil
Arsénico	Menos de 1ppm	---	Acido dietildithiocarbónico/Ag
Metales Pesados	Menos de 10ppm	---	Sulfuro de Sodio

Tabla 3. Características del fucoidán. Proporcionado por la Dra. Elizabeth Cruz Suárez del Programa de Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, extraído de *Cladosiphon okamuranus* por Kadoya & Co.

5.2. Evaluación del Efecto Citotóxico de Fucoidán

5.2.1. “in ovo”

5.2.1.1 Determinación de la Viabilidad de los Embriones.

Los embriones de pollo utilizados se obtuvieron de “Productora de Pollo de Engorda de Nuevo León SA de CV.”; en el municipio de Salinas Victoria por medio del Dr. Ignacio Muñoz; dichos embriones proceden de aves libres de enfermedades (Newcastle, Influenza, Salmonella, etc.). Los embriones fueron incubados a 39 °C con humedad y con movimiento regular, hasta tener 9 días para su inoculación (*figura 10*).



Figura 10. Embrión de pollo de 9 días

5.2.1.2 Inoculación de Fucoidán por Vía Alantoidea.

Se utilizaron embriones de 9 días. Se trasluminó cada huevo embrollando en un ovoscopio para determinar su viabilidad, se delimitó la cámara de aire con lápiz y se marcó, se desinfectó y se perforó el sitio de la inoculación vía alantoidea. (*figura 11*); se introdujo la aguja aproximadamente 2 cm dejando el inóculo (1, 5, 10, 50, 100, 150, 200 y 250µg de fucoidán en 0.2mL) en la cámara alantoidea (3 embriones por dilución). Se selló la perforación y se dejaron incubar los embriones por 48 h a 37 °C.



Figura 11. Sitio de inoculación vía alantoidea

5.2.1.3 Análisis de los Embriones Inoculados con Fucoidán.

Después del periodo de incubación (48h), se realizó un análisis del tamaño y aspecto de los embriones, posteriormente se realizó la necropsia y se tomaron muestras de

hígado para estudios histopatológicos los cuales fueron realizados por el Dr. Ricardo Fuentes Pensamiento (Hospital Santa Engracia).

5.2.2. “*in vitro*”

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

Se utilizaron 3 embriones de 9 días, se trasluminaron 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% (ver apéndice). Se retiró cabeza, patas, vísceras y columna vertebral, el tejido restante se transfirió a una jeringa de 5mL y fue filtrado a través de un embudo con gasa para depositarlo a 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 ahora 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 observaron 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 cultivo secundario de fibroblastos de embrión de pollo (CSFEP) disgregando las células de CPFEP con 2 mL de EDTA-tripsina atemperizada. Se obtuvieron 8 botellas y se dejaron propagar hasta que se observó una confluencia del 90% para los ensayos.

5.2.2.2 Determinación del Efecto de Fucoidán sobre la Viabilidad Celular por la Técnica Colorimétrica Basada en la Reducción de la Sal de Tetrazoilo (MTT).

El cultivo secundario de fibroblastos de embrión de pollo (CSFEP) se transfirió a cajas de 96 pozos (6000 células por pozo), y se incubó a 37 AC y 5% de CO₂ hasta obtener una confluencia de 80-90%. Se eliminó el medio de las placas y se agregó 100 µl del fucoidán por pozo a diferentes concentraciones: 10, 50, 100, 500, 1000, 1500, 2000 y 2500 µg/mL (tres pozos para cada concentración). Se dejaron 3 pozos para control sin fucoidán, el ensayo se realizó por triplicado. Las placas fueron incubadas durante 48 h a 37AC y 5% de CO₂.

Se preparó 0.025 g del reactivo MTT en 5 mL de PBS 1x, para obtener una concentración de 5 mg/mL de solución de MTT; al término de la incubación, se les eliminó el medio D-MEM/F12 a las placas con CSFEP tratadas con fucoidán., se agregó 22 µL de la solución de MTT a cada pozo y se incubó a 37AC hasta observar un cambio de color. Se adicionó 100 µl de DMSO (dimetilsulfóxido) para solubilizar las sales de formazán a todos los pozos, se incubó durante 8 min, posteriormente se tomó la medición de absorbancia a 570 nm en el lector de ELISA.

5.3 Efecto Antiviral

5.3.1 Propagación del Virus NDV en Embrión de Pollo

Para la propagación viral se utilizó una vacuna de NDV cepa LaSota (Agrovet), se reconstituyó como lo indicó el fabricante, se inoculó 0.2mL del virus vacunal vía alantoidea a 3 embriones de 9 días previa observación por el ovoscopio para certificar viabilidad y localización de los embriones, se incubaron a 37°C por 72 h. Al término de este tiempo se cosechó el líquido alantoideo, se centrifugó a 800rpm por 10min, se recolectó el sobrenadante, se seccionó en alícuotas de 1mL cada uno y se congeló a -70 °C.

5.3.2 Titulación del virus de Newcastle por Microhemoaglutinación

Se realizaron diluciones dobles seriadas de la suspensión viral desde 1:10 hasta 1:2560. En una placa de 96 pozos de fondo “V” se depositó 50 µL de PBS en cada pozo, se agregaron 50µL de cada dilución viral en tres pozos, dejando 3 pozos para control positivo (vacuna NDV) y 3 pozos para control negativo (medio). Posteriormente se agregaron 50 µL de la suspensión al 0.5% de eritrocitos de humano tipo “O” a cada pozo (ver apéndice). El punto final de la titulación del virus está en la dilución más alta del antígeno que produzca 100% de hemoaglutinación, en esta dilución se considera que existe una unidad hemoaglutinante (una unidad hemoaglutinante es la mínima cantidad de virus que puede aglutinar los glóbulos rojos).

5.3.3 Titulación del NDV por DICT₅₀

Se preparó cultivo secundario de fibroblastos de embrión de pollo en cajas de 96 pozos (6000 células por pozo) y se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ hasta obtener una confluencia del 90%. Se realizaron diluciones en base 10 de NDV en D-MEM/F12 a partir de 1:10 hasta 1:10⁹. Se eliminó el medio de las placas y se agregaron 100 µL de las diluciones virales (6 repeticiones de cada dilución). Se incubaron durante 48h a 37 °C y 5% de CO₂. Se observó el ECP en el microscopio invertido y se calculó el título mediante el método de Reed y Muench (1938).

5.3.4 Evaluación del Efecto Antiviral “*in ovo*”

5.3.4.1 Fucoidán Aplicado una Hora Antes de la Infección Viral (H -1).

Se inocularon los embriones vía alantoidea con 0.1mL de fucoidán (2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640,1280 o 2560µL/mL), se agitaron cuidadosamente para mezclar, se incubaron 1h, posteriormente se inoculó 10,000 DICT₅₀ del virus en 0.1mL de medio D-MEM/F12 a cada embrión, se agitaron cuidadosamente, se selló la perforación y se dejaron incubar a 37 °C con movimiento regular por 72 h. Se cosechó el líquido alantoideo y se realizaron pruebas de hemaglutinación en placa, microhemoaglutinación y RT-PCR.

5.3.4.2 Fucoidán Aplicado al Mismo Tiempo de la Infección Viral (H 0).

Se inocularon los embriones vía alantoidea con 0.1mL de fucoidán (2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640,1280 y 2560µL/mL) se agitaron cuidadosamente para mezclar e

inmediatamente después se inocularon con 10,000 DICT₅₀ del virus en 0.1mL de medio D-MEM/F12, se agitaron cuidadosamente, se selló la perforación y se incubaron a 37°C con movimiento regular durante 72 h. Se cosechó el líquido alantoideo y se realizaron pruebas de hemaglutinación en placa y microhemoaglutinación.

5.3.4.3 Fucoidán Aplicado una Hora Después de la Infección Viral (H 1).

Se inocularon los embriones vía alantoidea con 10,000 DICT₅₀ del virus en 0.1mL de medio D-MEM/F12, se agitaron cuidadosamente para mezclar, se incubaron 1h y posteriormente se inocularon con 0.1mL de fucoidán (2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640,1280 o 2560µL/mL) se agitaron cuidadosamente, se selló la perforación y se incubaron a 37°C con movimiento regular durante 72 h. Se cosechó el líquido alantoideo y se realizaron pruebas de hemaglutinación en placa y microhemoaglutinación.

Prueba de Hemaglutinación en Placa:

Para verificar presencia del virus. Se utilizó una placa de vidrio desinfectada, se colocó 50µL del líquido alantoideo obtenido, se agregó 50µL de solución de glóbulos rojos (previamente lavados) al 5%, se mezcló por movimientos de rotación durante 1-2 min. La aglutinación de los glóbulos rojos indicó un resultado positivo a la prueba.

5.3.4.4 RT-PCR.

5.3.4.4.1 Extracción de RNA a partir del Fluido Alantoideo. A 200 µL de líquido alantoideo obtenido de cada uno de los embriones tratados se le agregó 1mL de trizol (Probiotek) resuspendiendo con pipeteo y vortex, se incubó 5 min en el termoblock a 30 °C para la separación de fases, permitiendo la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas. Posteriormente se le adicionó 0.2 mL de cloroformo al 99% y mezcló con vortex por 15 segundos y luego se centrifugó a 14000 rpm por 20 min, donde se formaron 2 fases, la fase orgánica de color rojo (fenol: cloroformo) que contiene el DNA y proteínas (inferior) y la fase acuosa que contiene el RNA. Se recuperó la fase acuosa y se le adicionó 500µL de isopropanol frío, después se centrifugó a 14000 rpm por 15 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y el pellet se reconstituyó con 1 mL de etanol al 75 % (para lavar el RNA) luego

se centrifugó a 7,500 rpm por 5min a 4°C, se retiró el sobrenadante, el pellet se dejó secar en el termoblock a 60°C, y posteriormente se reconstituyó con 20 µL de agua DEPC.

5.3.4.4.2 Síntesis del DNAc. Después de extraer el RNA viral, se realizó la síntesis de DNAc, utilizando la técnica de “Transcripción reversa” (RT). En un tubo eppendorf se preparó una mezcla con 2 µL del Buffer RT 10X, 0.8µL de dNTPs (100mM), 2µL de Random primer (50µg), 1µL de RT de MuLV (500U/µL), 4.2µL de agua DEPC y 10µL de RNA (dilución 1:10), dando un volumen final de 12µL, se colocaron las muestras en el termociclador por 10 min a 25 °C, y a 37 °C por 2 h Se cuantificó el DNAc en espectrofotómetro y se ajustó a una concentración de 100ng/µL.

5.3.4.4.3 PCR. Se preparó una mezcla en un tubo eppendorf con lo siguiente: 2.5µL del Buffer 10X sin Mg, 0.5µL de dNTPs (10mM), 0.6µL TaqDNA Polimerasa (3U), 0.7µL MgCl₂ (1mM), 2µL Primer F de NDV (25pmol) y 2µL Primer R de NDV (25pmol) (*tabla 4*), 2µL de DNAc (200ng) y se aforó a 25µL con agua DEPC (por muestra) (*tabla 5*).

NDV-F	5080-5100nt	5'-TGG GAA GAT GCA GCA RTT TG -3'	%GC = 42
NDVF-rev	5396-5374nt	3'-RCC CAA GAG TTG AGT CTG TGA-5'	%GC = 47

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para el PCR de NDV (fragmento amplificado de 5080 a 5396) (Farkas et al., 2007).

Componentes	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen por reacción (µl)
•Buffer 10X (500 mM KCl 1000 mM Tris-HCl)	10X	1X	2.5
•dNTPs	10mM	5mM	0.5
•TaqDNA polimerasa	5UI	3U	0.6
•MgCl ₂	1mM	0.9mM	0.7
•Primer NDV-F	415.5pmol	25pmol	2
•Primer NDV-R	502pmol	25pmol	2
•cDNA		200ng/µl	2
•Agua DEPC			14.7
•Reaccion Total			25

Tabla 5. Concentraciones de los reactivos utilizados en el PCR para NDV

Las muestras se colocaron en un termociclador y se sometieron al programa de amplificación descrito para los oligonucleótidos escogidos de NDV (Farkas *et al.*, 2007) (tabla 6).

Los productos de amplificación por RT-PCR (316pb) se identificaron en geles de agarosa al 0.8% teñidos con bromuro de etidio y se fotodocumentaron.

	Temperatura	Tiempo
40 Ciclos	94°C	7 minutos
	95°C	30 segundos
	58°C	30 segundos
	72°C	60 segundos
	72°C	7 minutos

Tabla 6. Condiciones de PCR para NDV

5.3.5 Ensayo Antiviral “*in vitro*”

5.3.5.1 Cultivo de Células VERO (riñón de mono verde africano).

Las células VERO fueron cultivadas en botellas de 25 cm² con medio D-MEM/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.

5.3.5.2 Inhibición de Sincicios por Fucoidán.

Se utilizaron placas de 12 pozos, en donde se propagaron células VERO (50,000 células en cada pozo) y al obtener 90% de confluencia, se les retiró el medio D-MEM/F12, se les agregó el fucoidán a diferentes concentraciones (1, 10, 100 o 1000µg /mL) en un volumen de 500µL por cada pozo (tres pozos por dilución), se dejaron 1 h de incubación a 37°C, se lavaron los pozos tres veces con medio 199 y luego se infectaron con virus Newcastle (500 ó 1000 DICT₅₀), se dejó una 1 h de incubación a 37°C, se realizaron lavados y se les agregó fucoidán a la misma concentración inicial.

Cuando el control viral presentó el efecto citopático característico del virus Newcastle (sincicios) a las 30h aproximadamente, se retiró el medio de los pozos, se fijó con metanol acetona y se tiñó con hemocolorante rápido (Hycel). Se realizó el conteo de núcleos en 10 sincicios de cada pozo.

5.3.5.3 Disminución de Proteínas Virales por Efecto del Fucoidán.

Se utilizaron placas de 12 pozos con una monocapa confluyente de células VERO, las cuales fueron infectadas con 1,000 DICT₅₀ del virus NDV en 500µL de medio D-MEM/F12 a 4°C, se dejó adsorber una h a 4°C (ya que la adsorción de los paramixovirus son independientes de temperatura) dándole ligeros movimientos cada 15min. Al término de este tiempo se le realizaron 3 lavados con medio 199 a temperatura ambiente (para retirar los virus que no se adsorbieron), se les agregó 500µL de medio D-MEM/F12 sin y con fucoidán a una concentración de 100µg/mL, se dejó incubar a 37°C con 5% de CO₂ y a las 0, 3, 6 y 9 h post-infección se realizó la extracción de proteínas (2 pozos/tiempo).

5.3.5.3.1 Extracción de Proteínas. A los tiempos señalados anteriormente se removió el medio a las células VERO infectadas y tratadas con fucoidán, se realizaron lavados con medio 199 y se adicionó PBS 1X+EDTA 1mM. Se desprendió la monocapa celular con la

ayuda de un “scraper”, lo obtenido se colocó en un tubo eppendorf, se centrifugó a 3000rpm por 5 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el paquete celular con 50µL de buffer de extracción (ver apéndice) y se incubaron en hielo por espacio de 30 min. Se centrifugó a 3000rpm por 5 min a 4°C, el sobrenadante fue almacenado a -70°C. Se utilizó el método Lowry para la cuantificación de proteínas.

5.3.5.3.2 Western Blot. Para determinar los niveles de las proteínas virales expresadas en las células VERO tratadas con fucoidán se realizaron ensayos de Western Blot.

5.3.5.3.2.1 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE). Se utilizó 50µg de proteína total, la cual se desnaturizó en buffer de carga (ver apéndice) 5 min a 95°C.

Se armó el cassette para el gel de la electroforesis vertical. Primero se preparó el gel separador al 10% (ver apéndice) y se colocó en el cassette sin producir burbujas, Se preparó el gel concentrador al 5% (ver apéndice), se vació hasta el límite del vidrio, colocando el peine. Se colocó en la cámara de corrimiento con su buffer de corrida 1X (ver apéndice). Se retiró el peine y se lavaron los pocillos con buffer de corrida para eliminar la acrilamida no polimerizada. Se depositaron las muestras en los pocillos y se llevó a cabo la electroforesis 2 h a 80 Volts.

5.3.5.3.2.2 Transferencia a membrana de nitrocelulosa. Para la transferencia de las proteínas se utilizó un bastidor GIBCO. La membrana de nitrocelulosa se equilibró con buffer de transferencia 1X (ver apéndice) durante 10 min. También se colocaron en el buffer 2 piezas de papel filtro y 4 esponjas. Se cortó el gel separador del gel concentrador y se colocó sobre el papel filtro humedecido, despegándolo del vidrio. Sobre el set de transferencia se colocaron 2 esponjas, el papel filtro y el gel. Sobre el gel se colocó la membrana equilibrada formando un “sándwich”. Sobre la membrana se colocó papel filtro, se eliminaron las burbujas y posteriormente se colocaron las esponjas húmedas. La secuencia de transferencia, en dirección del polo negativo al positivo quedó “esponjas- papel filtro- gel de poliacrilamida- membrana de nitrocelulosa- papel filtro- esponjas”. (figura12). El “sándwich” se colocó en buffer de transferencia y se corrió en la cámara de transferencia a 25 Volts por 2 h.

TRANSFERENCIA ELECTROFORÉTICA DESDE GEL DE POLIACRILAMIDA A MEMBRANAS

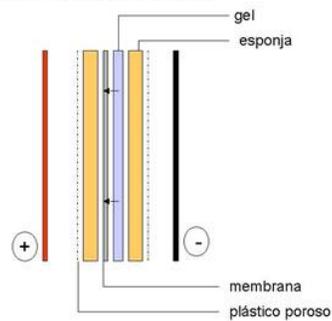


Figura 12. Representación grafica de la transferencia de proteínas

5.3.5.3.2.3 Inmunodetección. La membrana de nitrocelulosa se colocó en solución de bloqueo (ver apéndice) durante 1 h a 4°C. Posteriormente se realizaron tres lavados con TBS tween al 0.5% (ver apéndice) por 10 min a temperatura ambiente. Se dejó incubar toda la noche a 4 °C con el anticuerpo anti-NDV (IASA) a una dilución 1:500. Se realizaron tres lavados con TBS tween al 0.5% por 10 min a temperatura ambiente. Se colocó el anticuerpo secundario anti-chicken (Biomeda), a una dilución 1:10,000 y se dejó incubar por 2 h a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con TBS tween al 0.5% por 10 min. Se escurrió la membrana, se agregó solución NBT-BCIP (Amresco) y se mantuvo en agitación en oscuridad hasta que aparecieron las bandas, la reacción se detuvo con agua destilada.

5.4. Análisis estadístico.

Los datos se analizaron con el programa SPSS 10 para Windows, la significancia de las diferencias de respuesta entre los tiempos de aplicación y dosis de fucoidán, se determinaron por medio de un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba Duncan en base a un valor de $P < 0.01$.

6. RESULTADOS

6.2. Evaluación del efecto citotóxico del fucoidán

6.2.1 Efecto citotóxico “in ovo” en embrión de pollo

Para determinar si el fucoidán produce efecto citotóxico, se realizó un ensayo “*in ovo*” en el cual a embriones de 9 días se les inoculó fucoidán a diferentes concentraciones (2, 10, 20, 100, 200, 300, 400 y 500 μg) por vía alantoidea; a las 48 h se realizó la necropsia, no se observó ninguna diferencia en el tamaño y aspecto físico (hemorragias, atrofia, irritación, etc.) comparándolo con los embriones control no expuestos al fucoidán. (*figura 13*).



Figura 13. Comparación de tamaño y aspecto de los embriones tratados con fucoidán con el grupo control no tratados. Grupo 1 al 8: embriones tratados con 2, 10, 20, 100, 200, 300, 400 y 500 μg de fucoidán respectivamente.

En cuanto al estudio histopatológico de los hígados de embriones tratados con fucoidán, nos reveló un incremento de lípidos asociado a toxicidad en base a dosis respuesta: a partir de la

concentración de 200 μg se observó una esteatosis de 15-28%, la mayor concentración utilizada (500 μg) de fucoidán presentó una esteatosis de 27-56% (figura 14).

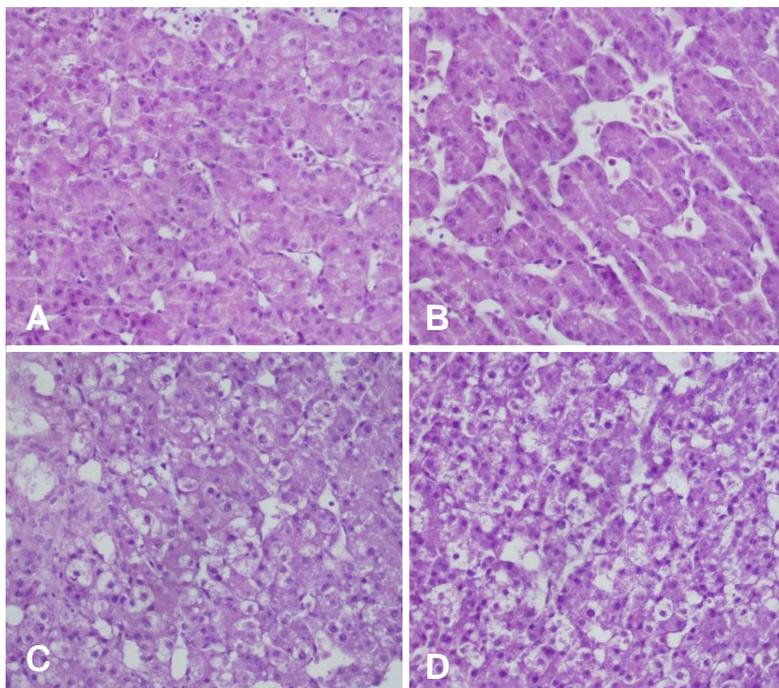


Figura 14. Cortes histológicos de hígados de embriones de pollo sometidos al fucoidán por 48h. A) Control no tratado. B) 20 μg de fucoidán, se observan hepatocitos normales. C) 200 μg de fucoidán, se observa esteatosis hepática leve (15-28%). D) 500 μg de fucoidán presenta esteatosis hepática moderada (27-56%). Cuando se utilizaron concentraciones de fucoidán menores de 20 μg , no se observó ningún cambio (fotos no mostradas) (Hematoxilina-eosina, 20x).

6.2.2. Efecto citotóxico “*in vitro*” en cultivo secundario de fibroblastos de embrión de pollo.

Para determinar la citotoxicidad de fucoidán “*in vitro*” se eligió como modelo experimental el cultivo de fibroblastos de embrión de pollo (CSFEP), ya que existen antecedentes de que el virus NDV se adapta e infecta satisfactoriamente, siendo un excelente hospedero para su replicación produciendo una clara evidencia de efecto citopático (Fenner *et al.*, 1974).

Se realizaron 3 ensayos con tres repeticiones, las células CSFEP crecidas a confluencia en placas de 96 pozos se sometieron a diferentes concentraciones de fucoidán durante 48 h, y posteriormente la viabilidad celular se determinó mediante la técnica de MTT como se describe

en material y métodos. Los porcentajes de viabilidad se muestran en la *figura 15*, donde se observa un incremento en la proliferación celular cuando se utilizaron bajas concentraciones (1 y 5 μg), así mismo el fucoidán presentó un mínimo efecto citotóxico a 50 μg ; obteniendo la CC_{50} a una concentración $> 100\mu\text{g}$ de fucoidán.

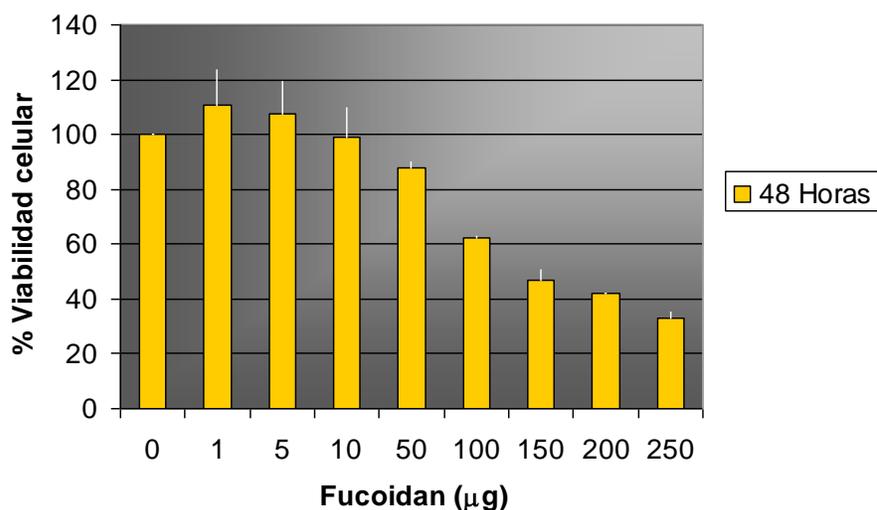


Figura 15. Efecto del fucoidán sobre la viabilidad de fibroblastos de embrión de pollo en cultivo. Los cultivos fueron sometidos a diferentes concentraciones del fucoidán de *C. okamuranus*, la gráfica muestra las desviaciones estándar correspondientes a $n=18$. * Porcentaje de viabilidad basado en el control.

6.3. Efecto Antiviral

6.3.1. Obtención del Título del virus de Newcastle por Microhemoaglutinación

Se realizó una microhemoaglutinación del abasto de NDV obtenido a partir del líquido alantoideo de embriones infectados con NDV vacunal cepa LaSota (Agrovét). Se realizaron diluciones seriadas al doble a partir de 100 μL del líquido alantoideo obteniendo un título de 640 UHA/100 μL .

6.3.2. Obtención del título del virus Newcastle por dosis infectiva en cultivo de tejidos al 50% (DICT_{50})

Para conocer la DICT_{50} del abasto viral obtenido en embriones de pollo, se infectaron células VERO con 100 μL de diluciones seriadas del abasto viral; a las 48 h se observó la presencia/ausencia del efecto citopático en las células cultivadas en placas de 96 pozos como se describe en material y métodos. La *tabla 7* muestra el porcentaje de los pozos infectados por

cada dilución (10^{-2} a 10^{-9}); mediante el método de Reed and Muench se calculó el título del abasto de NDV en $10^{6.15}$ DICT₅₀/mL.

DILUCION VIRAL	POZOS INFECT	POZOS NO INFECT	NUMEROS ACUMULADOS			% INFCT A/(A+B) × 100
			INFECT (A)	NO INFECT (B)	TOTAL (A+B)	
10 ⁻²	6	0	22	0	22	100%
10 ⁻³	6	0	16	0	16	100%
10 ⁻⁴	6	0	10	0	10	100%
10 ⁻⁵	3	3	4	3	7	57%
10 ⁻⁶	1	5	1	8	9	11.11%
10 ⁻⁷	0	6	0	14	14	0%
10 ⁻⁸	0	6	0	14	14	0%
10 ⁻⁹	0	6	0	14	14	0%

Tabla 7. Titulación del abasto de NDV en cultivo celular VERO. Se muestra el porcentaje de los pozos infectados por cada dilución (10^{-2} a 10^{-9}) del abasto de NDV.

6.3.3. Evaluación del efecto antiviral “*in ovo*”

6.3.3.1. Inhibición de la adsorción viral por bloqueo de receptores celulares (Hora -1) “*in ovo*”

Los embriones fueron inoculados con fucoidán a diferentes concentraciones, una hora después fueron infectados con 10,000 DICT₅₀ de NDV. A las 48h se cosechó el líquido alantoideo y se realizó una prueba cualitativa de hemaglutinación en placa, resultando todos positivos por lo que se realizó una prueba cuantitativa de microhemoaglutinación (HA), como se describe en materiales y métodos. Los embriones a los que se les aplicó el fucoidán una hora antes de la infección viral mostraron porcentajes de infectividad menores en todas las dosis utilizadas (figura 16), la dosis donde se obtuvo la mínima infectividad comparada con el control (10.5%) fue de 1µg de fucoidán. En la tabla 8A se muestra la disminución de títulos virales en los embriones tratados con fucoidán a diferentes dosis, en comparación con el control sin fucoidán.

El método estadístico Duncan muestra que en los ensayos donde se aplicó fucoidán, antes de la infección viral, a concentraciones de 0.25 a 16 µg/embrión dieron como resultado

porcentajes de infectividad bajos (mismo grupo de homogeneidad a), significativamente más bajos que con dosis de 32 a 256 $\mu\text{g}/\text{embrión}$ (mismo grupo de homogeneidad b).

6.3.3.2. Inhibición de la adsorción por bloqueo de receptores virales y/o celulares por competencia (Hora 0) “*in ovo*”.

Los embriones fueron inoculados con fucoidán, a diferentes dosis e infectados inmediatamente después con 10,000 DICT_{50} de NDV. A las 48h se cosechó el líquido alantoideo y se realizó una prueba cualitativa de hemaglutinación en placa, resultando todos positivos por lo que se realizó una prueba cuantitativa de microhemoaglutinación (HA), como se describe en materiales y métodos. Los embriones inoculados con el fucoidán al mismo tiempo de la infección viral mostraron porcentajes de infectividad menores en todas las dosis utilizadas (*figura 16*); las dosis del fucoidán con las que se obtuvo una mínima infectividad (26.4%) fueron de 0.5 y 1 μg . En la *tabla 8B* se observa la disminución de títulos virales en los embriones tratados con el fucoidán a diferentes dosis, en comparación con el control viral.

El método estadístico Duncan muestra que las dosis 0.25, 0.5, 1, 2, 4 μg , se encuentran en el grupo de homogeneidad (a), las dosis 4, 8, 16, 32, 64, 128, y 256 μg comparten el grupo más alto (c) y las dosis de 2 a 128 μg , están en un grupo intermedio (b); por lo que solo difieren significativamente las dosis de 0.25 a 1 μg (a) de la dosis 256 μg (c).

6.3.3.3. Inhibición de eventos post-adsorción de la infección viral (Hora 1) “*in ovo*”

Los embriones fueron infectados con 10,000 DICT_{50} de NDV y una hora después inoculados con fucoidán a diferentes dosis, se les extrajo líquido alantoideo para realizarles una prueba cualitativa de hemaglutinación en placa, resultando todos positivos por lo que se les realizó una prueba cuantitativa de microhemaglutinación. (HA), como se describe en materiales y métodos. Los embriones en este ensayo mostraron porcentajes de infectividad menores al control en todas las dosis utilizadas excepto la de 256 μg (*figura 16*), las dosis donde se obtuvo una mínima infectividad (33.3%) fueron de 0.5 y 1 μg del fucoidán. En la *tabla 8C* se observa, la disminución de títulos virales en los embriones tratados a diferentes dosis de fucoidán, en comparación con el control viral.

El método estadístico Duncan nos indica que las dosis 0.5 y 1 μg /embrión presentaron el menor porcentaje de infectividad (a), seguidos de las dosis 0.25 y 4 μg (b), y la dosis más alta (256 μg) dió el mayor porcentaje de infectividad (c).

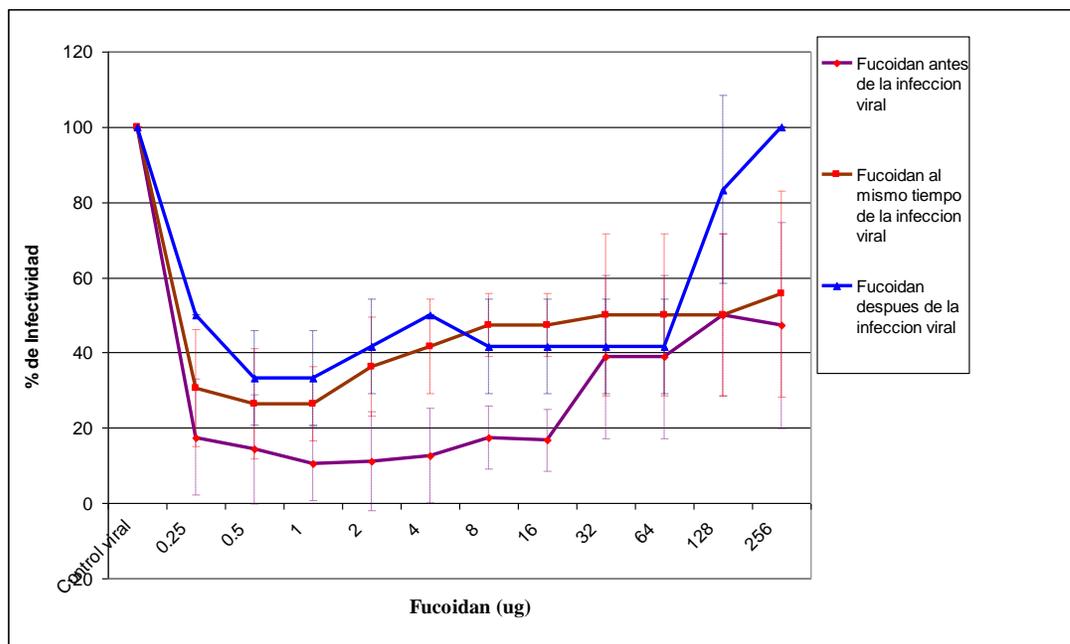


Figura 16. Inhibición de la infectividad de NDV “in ovo” por efecto del fucoidán. Porcentajes de infectividad de NDV “in ovo” a tres tiempos diferentes de aplicación del fucoidán. Desviación estandar de n=9

Dosis del fucoidán (µg/embrión)	Unidades Hemaglutinantes y porcentajes de infectividad " in ovo "								
	Hora-1 fucoidán antes de la infección			Hora 0 fucoidán al mismo tiempo			Hora 1 fucoidán después de la infección		
	A			B			C		
	UHA	% Infectividad	Desv. Std	UHA	% Infectividad	Desv. Std	UHA	% Infectividad	Desv. Std
0	640	100 ^d	0	640	100 ^d	0	640	100 ^d	0
0.25	111.1	17.4 ^a	9.1	195.6	30.6 ^a	15.5	320	50 ^b	0
0.5	91.1	14.29 ^a	8.7	168.9	26.4 ^a	14.6	213.3	33.3 ^a	12.5
1	71.1	10.5 ^a	3	168.9	26.4 ^a	9.8	213.3	33.3 ^a	12.5
2	71.1	11.17 ^a	2.6	231.1	36.1 ^{ab}	13.2	266.7	41.7 ^{ab}	12.5
4	80	12.56 ^a	5.3	266.7	41.7 ^{abc}	12.5	320	50 ^b	0
8	111.1	17.39 ^a	7.5	302.2	47.2 ^{bc}	8.3	266.7	41.7 ^{ab}	12.5
16	106.7	16.67 ^a	6.3	302.2	47.2 ^{bc}	8.3	266.7	41.7 ^{ab}	12.5
32	248.9	38.89 ^b	13.2	320	50 ^{bc}	21.7	266.7	41.7 ^{ab}	12.5
64	248.9	38.89 ^b	13.2	320	50 ^{bc}	21.7	266.7	41.7 ^{ab}	12.5
128	320	50 ^b	30.6	320	50 ^{bc}	21.7	533.3	83.3 ^c	25
256	302.2	47.22 ^b	23.2	355.6	55.6 ^c	27.3	640	100 ^d	0

Tabla 8. Ensayos de inhibición del NDV con fucoidán, mostrando el promedio de UHA, el porcentaje de infectividad y desviación estándar correspondientes a n=9. Las probabilidades de ANOVA entre las dosis del fucoidán (0.25-256µg/embrión) fueron altamente significativas a los tres tiempos (P<0.001 para A, B y C).

a Grupo de homogeneidad perteneciente a valores más bajos (Duncan, α=0.05)

b Grupo de homogeneidad perteneciente a valores intermedios (Duncan, α=0.05)

c Grupo de homogeneidad perteneciente a valores altos para (Duncan, α=0.05)

d Grupo de homogeneidad perteneciente a valores iguales al control sin tratamiento (Duncan, α=0.05)

6.3.3.4. Evaluación de la inhibición de biosíntesis viral por PCR

Se realizaron extracciones de RNA a partir del líquido alantoideo de embriones tratados con fucoidán una hora antes de la infección viral (Hora -1); se sintetizó y cuantificó el DNAc y se realizaron amplificaciones por PCR (con “primers” F de NDV) como se describe en materiales y métodos, observando una inhibición en los niveles de RNA viral a dosis de 4 y 16 μ g (figura 17).

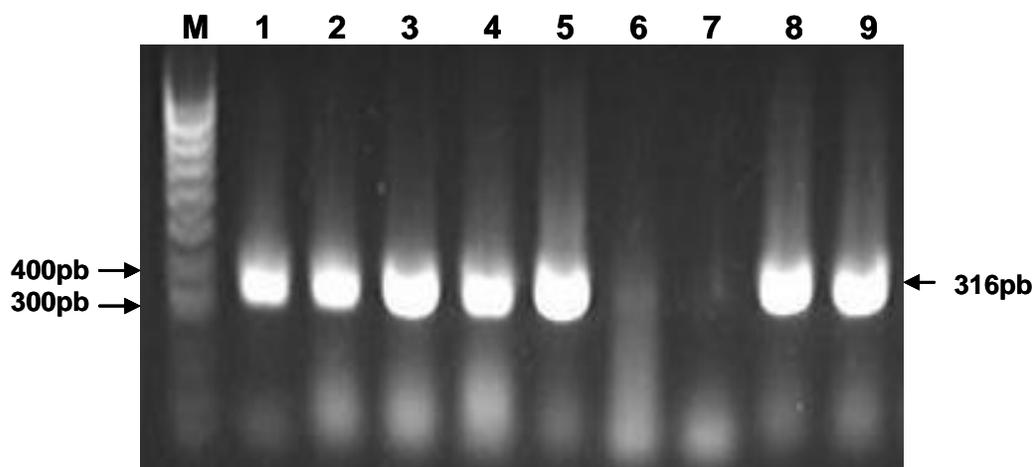


Figura 17. RT-PCR para NDV en el líquido alantoideo de embriones tratados con fucoidán, una hora previa a la infección con el virus. El carril 1 es el control, del 2 al 9 corresponden a 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 16, 32 y 64 μ g del fucoidán respectivamente.

6.3.4. “In vitro”

6.3.4.1. Inhibición de la fusión celular

El NDV, al igual que otros paramixovirus tienen la característica de introducirse al citoplasma para difundirse de célula a célula sin exponerse al medio extracelular (participando la glicoproteína F) originando la formación de células gigantes multinucleadas llamadas sincicios, apreciables en tejidos y en cultivos celulares (Morrison y Porther, 1991). Por esto decidimos analizar si el fucoidán era capaz de inhibir esta fusión de membranas.

Células VERO confluentes se trataron con fucoidán en diferentes dosis, se infectaron con 500 ó 1000 DICT₅₀ de NDV y posteriormente se retiró el virus y se volvió a agregar fucoidán a la misma dosis, permanecieron en incubación a 37 °C. Cuando el control viral presentó el efecto citopático característico del virus Newcastle (sincicios) a las 30h aproximadamente, se

retiró el medio de los pozos, se tiñó con hemocolorantes rápidos como se describió en material y métodos y se contaron los núcleos contenidos en 10 sincicios. Los sincicios formados en las células infectadas con NDV y tratadas con 0.1 y 1µg de fucoidán eran visiblemente más pequeños (contenían menos núcleos) en comparación con las células infectadas con NDV sin recibir tratamiento (*figura 18*). El número de núcleos incluidos en los sincicios: disminuyó 66.09% cuando se aplicó 1 µg del fucoidán, 52.76% cuando se aplicó 0.1 µg y a dosis de 10 y 100µg mostró un 100% de inhibición (*figura 19 y tabla 9*).

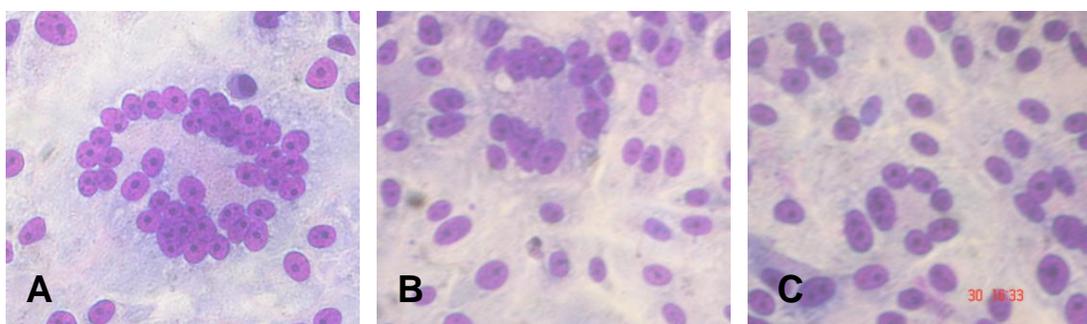


Figura 18. Efecto del fucoidán en los sincicios formados por NDV. A) Sincicio producido por NDV en células VERO B) Sincicio producido por NDV en células VERO tratadas con 0.1µg de fucoidán. C) Sincicio producido por NDV en células VERO tratadas con 1µg de fucoidán.

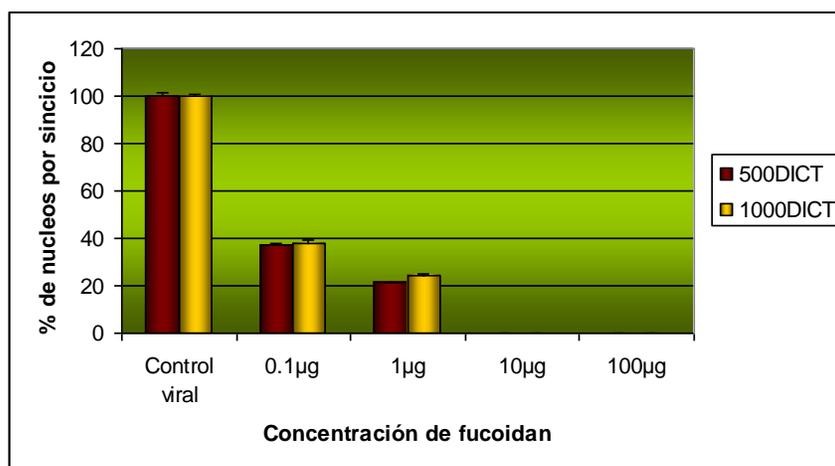


Figura 19. Relación dosis-respuesta del efecto del fucoidán sobre los sincicios formados por NDV: disminución en el número de núcleos por sincicio producidos por NDV en células VERO. El número de núcleos contenidos en cada sincicio se expresó en porcentaje del número promedio de núcleos por sincicio observado en el control viral sin fucoidán.

NDV	Tiempo de aplicación fucoidán		Concentración de fucoidán (µg)				
			0	0.1	1.0	10.0	100.0
500 DICT50%	Hora -1	Promedio	37.7	14.03	7.96	0	0
		Desv. Std.	1.4107	0.4163	0.1528	0	0
		% Inhibición	0	62.79	78.89	100	100
1000 DICT50%	Hora -1	Promedio	39.97	15.27	9.76	0	0
		Desv. Std.	0.4509	1.1547	0.9074	0	0
		% Inhibición	0	61.79	75.58	100	100

Tabla 9. Disminución de núcleos por sincicio producidos por NDV en células VERO tratadas con fucoidán. Mostrando el promedio de 10 sincicios, su desviación estándar correspondiente a n=18 repeticiones y el porcentaje de inhibición.

6.3.4.2. Comparación entre eficacia y toxicidad del fucoidán

Al comparar dosis efectivas y dosis que producían toxicidad “*in vitro*” se observó que las dosis del fucoidán que produjeron un 100% de inhibición del ECP (sincicios) de NDV eran inocuas para las células, incluso a dosis de 1 y 10µg del fucoidán se estimuló la proliferación celular (figura 20). Por lo tanto se demuestra que las dosis efectivas contra NDV no son citotóxicas para las células.

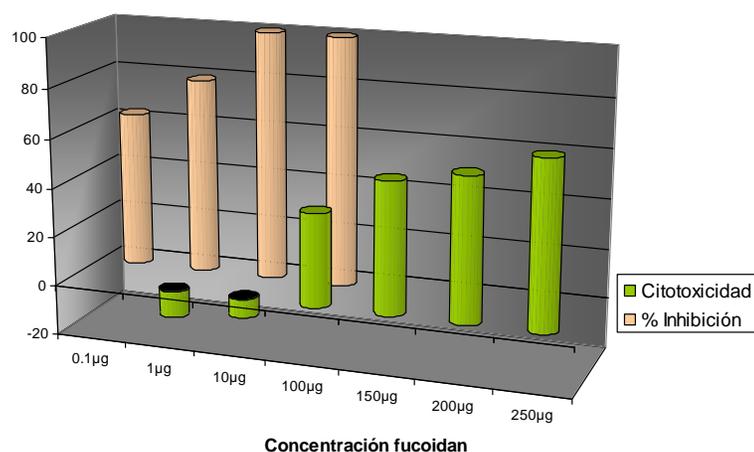


Figura 20. Comparación entre la eficacia y toxicidad del fucoidán. Se muestran los porcentajes de la inhibición del ECP producido por NDV (sincicios), en comparación con la citotoxicidad, a diferentes dosis del compuesto.

6.3.4.3. Evaluación de la inhibición de la biosíntesis viral por Western Blot

Para evaluar el efecto del fucoidán en la biosíntesis de proteínas de NDV, se realizó el análisis en células VERO, infectadas con 1,000 DICT₅₀ de NDV, no tratadas y tratadas con 10µg de fucoidán y llevadas a inmunodetección a las 3, 6 y 9h post-adsorción del virus, con anticuerpos policlonales contra NDV.

La *figura 21* demuestra una disminución evidente en la banda que corresponde a la proteína M de NDV y la ausencia de las bandas que corresponden a las proteínas HN y F, a las 9 h post-infección en las células tratadas con fucoidán.

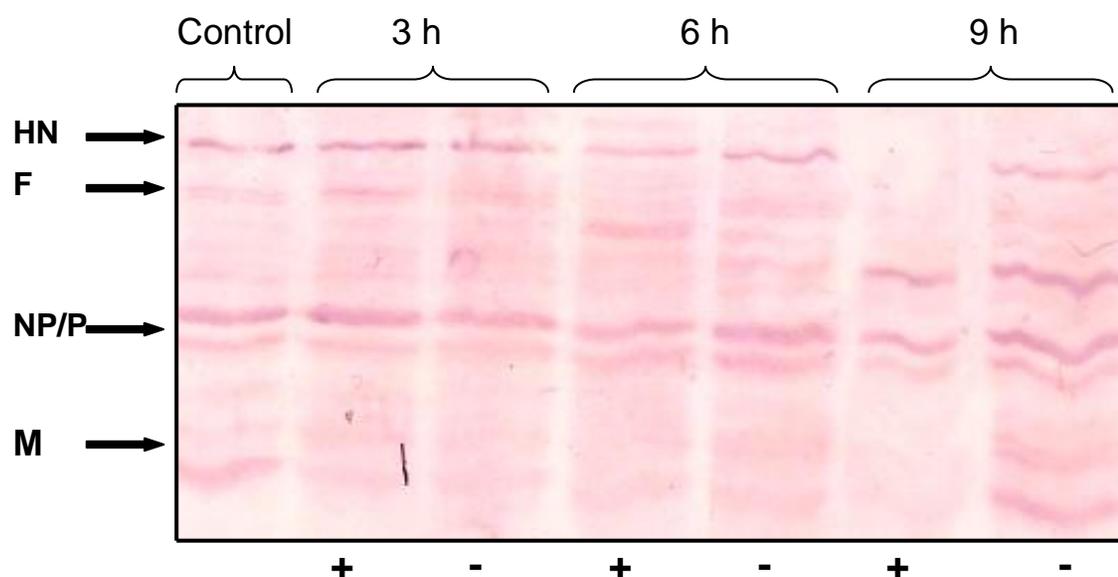


Figura 21. Análisis de la inhibición de proteínas de NDV por fucoidán a diferentes tiempos del ciclo viral. Monocapas confluentes de células VERO fueron infectadas con 100 DICT₅₀ de NDV, en forma simultánea se trataron con 10µg de fucoidán y sus proteínas fueron extraídas a las 3, 6 y 9 post-infección. El extracto proteico fue desnaturalizado y sometido a un ensayo de western blot. (+) con tratamiento, (-) sin tratamiento.

7. DISCUSIÓN

Conociendo las grandes pérdidas que ocasiona la Enfermedad de Newcastle y las reacciones post-vacunales severas producidas por un mal manejo en la industria avícola, es urgente contar con un antiviral preventivo, que sea eficaz, económico, de fácil empleo y sin efectos adversos. En nuestro estudio, los resultados encontrados demostraron que el fucoídán extraído del alga parda *Cladosiphon okamuranus* cumple con las características de eficacia y ausencia de efectos adversos, quedan por definir sus condiciones de empleo.

EFFECTO ANTIVIRAL “*IN OVO*”

Una parte muy importante de esta investigación se realizó en el modelo “*in ovo*”, porque el embrión aviar, especialmente el embrión de pollo, es fuente de tejido vivo valioso y ampliamente utilizado para el aislamiento inicial y pasaje subsecuente de muchos virus, para abasto viral, titulación y para la producción de vacunas. Los embriones de pollo han sido usados desde los trabajos de Rous y Murphy en 1911, debido a su disponibilidad, economía, tamaño conveniente, relativa libertad de infecciones latentes y contaminación externa, así como falta de producción de anticuerpos contra el inoculo viral. La ruta de inoculación utilizada fue la cavidad alantoidea ya que el virus de Newcastle crece bien en el ectodermo alantoideo y se puede obtener grandes cantidades de liquido alantoideo, el cual es fácilmente purificado y cuantificado por hemoaglutinación (Cox, 1952).

En los ensayos antivirales “*in ovo*” obtuvimos un 73.6% de reducción de la infectividad del virus Newcastle con 0.5µg de fucoídán/ embrión, cuando éste se inoculó al mismo tiempo que la infección viral (H0) y el efecto fue mayor (85.7%) cuando se administró una hora antes de la infección con el virus (H-1). Los resultados obtenidos en los 2 tiempos de administración del fucoídán (H-1 y H0) “*in ovo*”, nos sugieren que el fucoídán impide la adsorción y penetración del virus NDV a las células. Olofsson y Bergstrom (2005) mencionan que los polisacáridos con carga negativa inhiben la adsorción de los virus a la membrana celular al interferir con la unión electrostática entre la membrana celular y la envoltura viral; el fucoídán de *C. okamuranus* utilizado en esta investigación probablemente utiliza este mecanismo de inhibición ya que se encuentra cargado negativamente al tener 1 residuo sulfato en cada molécula (Nagaoka *et al.*,

1999). Estos hallazgos son comparables con los resultados de Serkedjieva (2004) donde se analizó extractos de alga roja *Ceramium rubrum* contra Influenza A utilizando este mismo modelo (“*in ovo*”) encontrando reducción de la infectividad en las primeras etapas de la infección viral y a dosis no tóxicas para el embrión. Otros investigadores han evaluado exitosamente el efecto antiviral de otros compuestos de origen natural a través de la reducción de la infectividad en embriones de pollo como en el caso de Peña (2007) que evaluó el efecto antiviral de un extracto de *Punica granatum* frente el virus Influenza tipo A ($CE_{50} = 125\mu\text{g/mL}$).

Por otro lado al aplicar el fucoidán una hora después de la infección viral se obtuvo 66.7% de inhibición a una dosis de $0.5\mu\text{g}$; esta actividad inhibitoria del fucoidán se presentó sin causar efecto tóxico al embrión. Estos resultados nos sugieren que este compuesto también tiene actividad antiviral en etapas posteriores a la penetración del virus nuestros resultados coinciden con varios trabajos realizados en modelos “*in vitro*”: con los resultados de Hoshino *et al.* (1998) donde encontraron la inhibición en etapas posteriores a la adsorción de HSV, citomegalovirus y HIV, al aplicar fucoidán extraído de *Sargassum horneri* post-adsorción; concuerdan también con los resultados obtenidos en el trabajo realizado por Schaeffer y Krylov (2000), con fucoidán extraído de *F. vesiculosus* en el cual demostraron una inhibición de la infección de HIV tanto en etapas iniciales (la unión y la penetración a las células) como en etapas posteriores a la penetración del virus; así como también con los resultados encontrados por Preeprame *et al.* (2001) donde demuestran que el fucoidán extraído de *Sargassum horneri* inhibe la replicación de HSV-1 al ser añadido posterior a la infección viral.

La detección del genoma viral mediante RT-PCR en los ensayos realizados a la hora -1, donde se observó inhibición del RNA viral con las dosis 4 y $16\mu\text{g}$ de fucoidán nos permitieron apoyar los resultados de inhibición de unidades hemaglutinantes (UHA), con la ventaja que éste método nos permite detectar directamente el genoma viral a diferencia de la hemaglutinación la cual cuantifica no solo los viriones sino también partículas virales inactivas. Sin embargo, estos solo son estudios preliminares y se requiere realizar PCR tiempo real para poder cuantificar la carga viral en cada uno de los tratamientos.

“EFECTO ANTIVIRAL IN VITRO”

En cuanto al modelo “*in vitro*” (CSFEP y células VERO) utilizado en el estudio nos permitió constatar el efecto inhibitorio de la replicación viral, de acuerdo a dos ensayos realizados:

Inhibición de la fusión celular

El fucoidán bloqueó el mecanismo de fusión célula-célula en la infección por NDV, con la consecuente disminución del tamaño de los sincicios y reducción en el número de núcleos contenidos en los mismos (disminuyó 66.09% a dosis de 1 µg del fucoidán y a dosis de 10µg mostró un 100% de inhibición). La proteína F del virus se sintetiza como un precursor F0, y después es cortada en subunidades F1 y F2 por enzimas de la célula hospedera; este corte y la exposición del segmento hidrofóbico (en el extremo N-terminal de F1 es necesario para la activación de la fusión y determinante en la infectividad y patogenicidad del virus Newcastle. El precursor F0 tiene una región rica en aminoácidos básicos cerca del sitio de corte y autores como Fujita *et al.* (2007) sugieren que la heparina se une a esta región. El fucoidán probablemente también se una a esta región evitando que se desencadene la fusión celular.

Nuestros resultados fueron muy similares a los de Romanos *et al.* (2002) donde se estudió un efecto antiviral del fucoidán extraído de *Laminaria abyssalis*, en cultivo de células HeLa infectadas con el virus linfotrófico T humano -1 (HTLV-1); a una concentración de 100 µg/ml del fucoidán se obtuvo una inhibición de casi 100% de la formación de sincicios y a una concentración de 25 µg/ml se obtuvo una inhibición de casi 95%. También Nakashima *et al.* (1987) encontraron que el fucoidán pudo bloquear la formación de células gigantes entre células infectadas con HIV-1 y células sin infectar CD4 positivas; este efecto anti-HIV fue debido a la interacción del polisacárido con el “loop” de V3 de gp120 y la unión del polisacárido en el dominio N-terminal de gp41.

Inhibición de proteínas virales

Al llevar a cabo el análisis por western blot de la expresión de proteínas de NDV en células VERO infectadas en presencia y ausencia de fucoidán, demostramos a las 9 h post-infección una disminución evidente en las bandas que corresponden a las proteínas M, HN y F del virus. Esto concuerda con los resultados de Morales (2008) en células VERO infectadas con Distemper canino y tratadas con fucoidán de *C. okamuranus* donde observaron a los tiempos 3,

6 y 9 h post-infección una disminución de las proteínas de nucleocápside comparadas con el control sin tratamiento. Estos estudios reafirman que el mecanismo antiviral del fucoidán no solo actúa en etapas tempranas del ciclo viral (adsorción y penetración) sino que también modifica y/o degrada las proteínas virales.

EFEECTO CITOTOXICO “*IN OVO*”

Con respecto al efecto citotóxico, nuestros resultados muestran que el fucoidán analizado en el modelo “*in ovo*” no produjo ningún efecto tóxico para el embrión a dosis efectivas antivirales (0.5 a 128µg/embrión); a partir de la dosis 500µg/embrión (2500µg/mL) se encontró esteatosis hepática moderada (27-56%), este depósito de lípidos se ha presentado en casos de toxicidad producida a dosis efectivas antivirales de estaduvina para el tratamiento de HIV (Lenzo *et al.*, 1997; Lai *et al.*, 2004) y de otras sustancias como el alcohol (Sierra y Torres, 2004). En nuestro estudio, no hubo muerte embrionaria en ninguna de las dosis utilizadas, a diferencia de los estudios de Peña (2007) que evaluó el efecto antiviral de un extracto de *Punica granatum* frente el virus Influenza tipo A, en el cual encontró que a dosis de 2500µg/mL había un 40% de muerte embrionaria, aunque coincidimos en que la dosis efectiva que obtuvieron ($CE_{50} = 125\mu\text{g/mL}$) fue mucho menor con respecto a la dosis citotóxica.

EFEECTO CITOTÓXICO “*IN VITRO*”

En el modelo “*in vitro*” el fucoidán no produjo efecto citotóxico a dosis efectivas, sino al contrario se encontró un aumento en el crecimiento celular. Este mismo efecto lo observaron con otros polisacáridos sulfatados los estudios de Flint *et al.* en 1994, donde el dextrán sulfato y polisulfato pentosan tenían efecto estimulante en la proliferación de los cultivos primarios de células epiteliales intestinales.

En otros estudios, García y Gil (1991) evaluaron el efecto inhibitorio “*in vitro*” del fucoidán (SIGMA) en la replicación de ASFV (virus de la fiebre porcina africana) en células VERO, encontrando un efecto citotóxico del fucoidán a concentraciones muy altas con una CC_{50} de 3000µg/ml, más alta a la encontrada en este estudio ($CC_{50} = 1500\mu\text{g/ml}$) en cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo, a la de nuestro grupo en células VERO de $CC_{50} > 2000\mu\text{g/ml}$ (Morales (2008)) y a la encontrada por Lee *et al.* (2004) donde la CC_{50} del fucoidán fue de

2000 µg/ml en las líneas celulares: VERO (riñón de mono verde africano), HEL (eritroleucemia humana) y MDCK (epitelio intestinal de perro).

Al comparar la eficacia del fucoidán como antiviral con otros antivirales comerciales como la ribavirina nuestro grupo de trabajo reportó que la ribavirina posee alta toxicidad a bajas concentraciones (CC_{50} 88.9µg/mL) en células VERO y un porcentaje de inhibición viral apenas de 47% a una dosis de 10µg/mL contra el virus de *Distemper canino*, otro miembro de la familia paramixovirus (Morales, 2008); en cambio nuestro compuesto mostró un efecto inhibitorio mayor al 50% contra Newcastle a dosis muy bajas (0.1 µg/mL) y un efecto tóxico para las células CSFEP (CC_{50} de \pm 1400µg/mL), mientras que en células VERO, Morales (2008); reportó una CC_{50} <2000, esto lo hace un candidato potencial para ser utilizado como antiviral.

En el caso de amantadina, se ha reportado efecto inhibitorio solo a dosis altas (arriba de 100µg/mL no alcanzable vía oral) en otros paramixovirus como virus respiratorio sincicial y parainfluenza (Couch y Six, 1985). La amantadina no se utiliza como profilácticos ya que produce resistencia viral a dosis tan bajas como <1 µg/mL presentando mutaciones puntuales en el gen codificador de la proteína M2 (Influenza). En cambio los polisacáridos sulfatados como el fucoidán podrían ser utilizados como preventivos, ya que reportes de Esté *et al.* (1994) en pases seriales de células MT-4 infectadas con HIV-1, aumentando la concentración de polisacáridos sulfatados en cada pase de 1 a 5000µg/mL., demuestran que estos tienen poca habilidad de producir mutantes virales resistentes.

La situación es que realmente no existe ningún antiviral que se utilice en la industria avícola, ya que es más costoso eliminar las parvadas enfermas a tener gastos extras de manejo para la medicación. Además a partir de marzo del 2006, la OIE, FDA, FAO y la OMS han prohibido el uso de antivirales tales como el oseltamivir, amantadina y rimantadina en pollos, patos y pavos a fin de preservar la eficiencia de estos medicamentos para el tratamiento de las infecciones de influenza en los seres humanos y no producir cepas resistentes.

En el contexto en el que cada día de ganancia de peso es crítico para cubrir la demanda del mercado y para mantener la producción de pollo de engorda como una actividad económica

viable, es de importancia primordial el mantenimiento de la salud de las aves. La mortalidad que resulta por Newcastle y otras complicaciones respiratorias es muy costosa para la industria avícola, produciendo pérdidas a nivel mundial de miles de millones de dólares (Kleven, 1997), aún cuando se lleve acabo programas de vacunación, ya que una vacunación inadecuada de Newcastle puede costarle a la compañía tanto como el desafío de campo, aunado al innecesario aumento de los costos por la medicación a causa de los microorganismos oportunistas y por el sacrificio de parvadas completas (Dhawale, 2005).

Es por eso, de suma importancia contar con un programa integrado de manejo preventivo donde se pueda incluir la administración de este antiviral sobre todo en periodos donde el ave se exponga al estrés.

Por lo tanto, con nuestra investigación podemos concluir que el fucoidán extraído de *C. okamuranus* analizado “*in ovo*” e “*in vitro*” es un buen inhibidor de la replicación de NDV al inhibir la adsorción, penetración, eventos post-adsorción y la formación de sincicios administrado a dosis no tóxicas para el embrión o para las células; se requiere realizar pruebas “*in vivo*” de este compuesto para establecer dosis y vías de administración y su farmacocinética.

8. CONCLUSIONES

1. El fucoidán extraído de *Cladosiphon okamuranus* produce efecto tóxico a dosis muy altas (100 veces mayores a la dosis antiviral) en los modelos estudiados “*in vitro*” ($CC_{50} = >1000\mu\text{g/mL}$) e “*in ovo*” (hepatotoxicidad moderada a $2500\mu\text{g/mL}$).
2. El fucoidán pudo inhibir NDV a dosis mínimas ($1\mu\text{g}$), bloqueando receptores celulares y/o virales.
3. El fucoidán inhibió los eventos post-adsorción en la infección viral a dosis de $1\mu\text{g}$.
4. El fucoidán inhibió la fusión celular (sincicios) en células infectadas con NDV ($CE_{50} = 0.1\mu\text{g}$).
5. El fucoidán disminuyó la concentración de proteínas virales M, HN y F a las 9 hrs post-infección comparadas con el control.
6. Por todo esto consideramos que: el fucoidán extraído de *Cladosiphon okamuranus* es un agente antiviral eficaz contra NDV, inhibiendo eventos tempranos de la replicación viral, sin causar daño a la célula.

APÉNDICE

1. PBS 1X

8 g NaCl

0.2 g KCl

1.44 g Na₂HPO₄

0.24 g KH₂PO₄

Aforar a 1 litro con agua destilada y ajustar el pH a 7.4

2. Solución de eritrocitos 0.5%

Centrifugar sangre O+ con PBS 1X, eliminar el sobrenadante y repetir hasta que el sobrenadante esté cristalino.

0.5 mL eritrocitos

99.5 mL PBS 1X

3. Buffer de extracción de proteínas 1X

0.1 mL Tritón X-100 100%

0.5 mL Tris-HCl 1 M pH 7.5

0.3 mL NaCl 5 M

Aforar a 10 ml con agua destilada

4. Buffer de Desnaturalización o buffer de carga

1.25 mL Tris-HCl 0.5M pH 6.8

2.5 mL Glicerol

2 mL SDS 10 %

0.2 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.

5. Preparación del Gel (10 ml)

Gel	4%	<u>5%</u>	6%	7%	8%	9%	10%	12%	14%
H₂O	6.1	5.7	5.4	5.1	4.7	4.4	4.1	3.4	2.7
A/B 30% (ml)	1.3	1.7	2.0	2.3	2.7	3.0	3.3	4.0	4.7
*Buffer (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
SDS 10% (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
PSA 10% (µl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
TEMED (µl)	10	10	10	10	10	10	10	10	10

*(10%) Gel Separador- Tris-HCl pH 8.8 1.5M

***(5%) Gel Concentrador-** Tris-HCl pH 6.8 0.5M

6. Acrilamida/Bisacrilamida

87.6 g de Acrilamida
2.4 g de Bisacrilamida
Aforar a 300 mL con agua destilada.

7. SDS 10%

10 g de SDS
Aforar a 100 mL con agua destilada.

8. Persulfato de amonio (PSA) 10%

100mg PSA
Aforar a 1 mL con agua destilada.

9. 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

10. 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.

11. Buffer de Corrida 10X

30.3gr Tris Base
144gr Glicina
10gr SDS
Aforar a 1 litro con agua destilada

12. Buffer de Transferencia 10X

144 g Glicina
30 g Tris Base
Aforar a 1 litro con agua destilada

13. Buffer de Transferencia 1X

100 mL Stock 10 X
200 mL de metanol
700 mL de agua destilada

14. Solución de Bloqueo

19 ml de TBS 5X
1 ml de Tween 20

1 gr de leche carnation Nestle Non Fat Dry Milk

15. TBS 10X

31.5 gr de Tris HCl

80gr NaCl

Ajustar a pH 7.6 y aforar a 1 Litro con agua destilada

16. TBS Tween al 0.5%

100 mL de TBS 10X

5 mL de Tween 20

Aforar a un Litro con agua destilada

LITERATURA CITADA

Ahamed T, Hossain KM, Billah MM, Islam KMD, Ahasan MM, Islam ME. 2004. Adaptation of Newcastle disease virus (NDV) on VERO cell line. *International Journal of Poultry Science* 3:153-156.

Alexander D J. 1997. Newcastle diseases and other avian paramyxoviridae infections. In: *Diseases of Poultry*, Calnek BW with Barnes HJ, Beard CW, Mc Dougald LR, Saif YM (eds). Iowa State University Press: Ames, Iowa, pp. 541-569.

Alexander DJ, 2000. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Revue scientifique et technique. International Office of Epizootics* 19:443-462.

Alexander DJ, 2001. Gordon Memorial Lecture. Newcastle disease. *British Poultry Science* 42:5-22.

Altmeyer R. 2004. Virus attachment and entry offer numerous targets for antiviral therapy. *Current Pharmaceutical Design* 10:3701-3712.

Andrei G, De Clercq E. 1990. Inhibitory effect of selected antiviral compounds on arenavirus replication in vitro. *Antiviral Research* 14:287-299.

Baba M, Snoeck R, Pauwels R, De Clercq E. 1988. Antimicrob sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, and human immunodeficiency virus. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 32:1742-1745.

Bagust TJ, Jones RC, Guy JS. 2000. Laringotraqueítis infecciosa aviar, *Revue scientifique et technique. International Office of Epizootics* 19: 483-492.

Balzarini J, McGuigan C. 2002. Chemotherapy of varicella-zoster virus by a novel class of highly specific anti-VZV bicyclic pyrimidine nucleosides. *Biochimica et Biophysica Acta* 1587:287-295.

Barreto PJ, Gundian GJ, Rodriguez M, Pino AP. 1998. Medicamentos antivirales. *Acta Medica* 8:86-100.

Beard CW, Hanson RP. 1984. Newcastle Disease. In: *Diseases of Poultry* Hofstad MS, Barnes HJ, Calnek BW, Reid WM, Yoder HW (eds). Iowa State University Press: Ames, Iowa, pp. 452-470.

Bean B. 1992. Antiviral therapy: current concepts and practice. *Clinical Microbiol Reviews* 5:146-182.

Berg M, Sundqvist A, Moreno-Lopez J, Linne T. 1991. Identification of the porcine paramyxovirus LPMV matrix protein gene: comparative sequence analysis with other paramyxoviruses. *The Journal of general virology* 72:1045-1050.

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.

Campadelli-Fiume G, Cocchi F, Menotti L, Lopez M. 2000. The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells. *Reviews in medical virology* 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 Medica* 63:429-432.

Chapman VJ, Chapman DJ. 1980. Seaweed and Their Uses. In: Chapman and Hall (eds). London, p 327.

Charzeddine L, Fariñas M. 2001. Propiedades bioactivas de algas marinas del nororiente de Venezuela. *Propiedades bioactivas de algas marinas*, pp 49-54.

Chotigeat W, Tongsupa S, Supamataya K, Phongdara A. 2004. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture* 233:23-30.

Clark DL, Su SD, Davidson EA. 1997. Saccharide anions as inhibitors of the malaria parasite. *Glycoconjugate Journal* 14:473-479.

Colliec-Jouault S, Millet J, Helley D, Siquin C, Fischer AM. 2003. Effect of low-molecular-weight fucoidan on experimental arterial thrombosis in the rabbit and rat. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 1:1114-1115.

Couch RB, Six HR. 1985. The antiviral spectrum and mechanism of action of amantadine and rimantadine. In: *New directions in antiviral chemotherapy*, Mills J, Corey L (eds). Elsevier Science Publishing, Amsterdam, pp 50-57.

Cooper R, Dragar C, Elliot K, Fitton JH, Godwin J, Thompson K. 2002. GFS a preparation of Tasmanian *Undaria pinnatifida* is associated with healing and inhibition of reactivation of Herpes. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2:11.

Cox HR. 1952. Growth of viruses and rickettsiae in the developing chick embryo. *Annals of the New York Academy of Sciences* 55:236-247

Cruz-Suarez LE, Hernandez J, Porchas-Cornejo M, Coronado-Molina DE, Linné-Unzueta-Bustamante ML, Nieto-Lopez M, Tapia-Salazar M, Ricque-Marie D. 2007. The antiviral effect of algal fucoidans. *AQUA Culture AsiaPacific Magazine* 3:19.

Dalgleish AG, Beverly PCL, Claphan PR. 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor of the AIDS retrovirus. *Nature* 312:763-767.

Davies WL, Grunert RR, Haff RF, McGahen JW, Neumayer EM, Paulshock M, Watts JC, Wood TR, Hermann EC, Hoffmann CE. 1964. Antiviral activity of 1-ada-mantanamine (amantadine). *Science* 144:862-863.

De Lara, Isassi G, Álvarez-Hernández S, Lozano-Ramírez C. 2005. Actividad antibacteriana de algas marinas de Oaxaca, Pacífico Tropical Mexicano. *Antibiosis Oaxaca* 1-6.

Deng R, Wang Z, Mahon PJ, Marinell M.O, Mirza AM, Iorio RM. 1995. Mutations in the NDV HN protein that interfere with its ability to interact with the homologous F protein in the promotion of fusion. *Virology* 253: 43-54.

Dewhurst S. 2004. Human herpesvirus type 6 and human herpesvirus type 7 infections of the central nervous system. *Herpes: the journal of the IHMF* 2:105A-111A.

Dhawale, A., 2005. Better eggshell quality with a gut acidifier. *Poultry International* 44:18-21.

Duarte ME, Cardoso MA, Nosedá MD, Cerezo AS. 2001. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydrate research* 333:281-293.

Ebata SN, Côté MJ, Kang CY, Dimock K. 1991. The fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins of human parainfluenza virus 3 are both required for fusion. *Virology* 183: 437-441.

Elion GB, Furman PA, Fyre JE. 1977. Selectivity of action of an antitherapeutic agent, 9(2-hidroxyethoxymethyl) guanine activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74:5716-5720.

- Eriksson BE, Helgstrand NG, Johnsson A. 1977. Inhibition of influenza virus ribonucleic acid polymerase by ribavirin triphosphate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 11:946.
- Errington, W, 1996. Characterisation of the proteins involved in the transcription and replication of Newcastle disease virus. Thesis (PhD). University of Newcastle upon Tyne, UK.
- 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. *Molecular pharmacology* 52:98-104.
- Farsang A, Wehmann E, Soos T, Lomniczi B. 2003. Positive identification of Newcastle disease virus vaccine strains and detection of contamination in vaccine batches by restriction site analysis of the matrix protein gene. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health* 50:311-315.
- Fenner F. 1974. The classification of viruses; why, when, and how. *The Australian journal of experimental biology and medical science* 52:223-240.
- Fenner F, Bachmann PA, Gibbs EPJ, Murphy FA, Studdert MJ, White DO. 1992. *Virología Veterinaria*. Acribia, S.A. 503-514.
- Flint N, Cove FL, Evans GS. 1994. Heparin stimulates the proliferation of intestinal epithelial cells in primary culture. *Journal of Cell Science* 107: 401-411.
- Freile PY. 2001. Algas en la botica. *CINVESTAV Avance Perspectiva* 20:283-292.
- Fujita K, Miura R, Yoneda M, Shimizu F, Sato H, Muto Y, Endo Y, Tsukiyama-Kohara K, Kai C. 2007. Host range and receptor utilization of canine distemper virus analyzed by recombinant viruses: Involvement of heparin-like molecule in CDV infection. *Virology* 359:324-35.
- Garcia-Villalón D, Gil-Fernández C. 1991. Antiviral activity of sulfated polysaccharides against African swine fever virus. *Antiviral Research* 15:139-148.
- Gnam JW, Barton NH, Whittley RJ. 1983. Acyclovir-mechanism of action, pharmacokinetics, safety and clinical applications. *Evaluations of new drugs. Pharmacotherapy* 3:275.
- Gohmn D, Thur B, Hofman M. 2000. Detection of Newcastle disease virus in organs and feces of experimentally infected chickens using RT-PCR. *Avian Pathology* 29:143-152.
- Goldsmith S, Whitley RJ. 1992. Antiviral drugs. In: *Infectious Diseases*, Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR (eds). WB Saunders: Boston, pp. 289-302.
- Goldstein D, Lazzlo J. 1988. The role of interferon in cancer therapy: a current perspective. *Cancer Journal for Clinicians* 38:258-277.

- Gravel KA, Morrison TG. 2003. Interacting domains of the HN and F proteins of Newcastle disease virus. *Journal of Virology* 77:11040-11049.
- Hall CB, Mc Bride JT, Gala CL. 1985. Ribavirin treatment of respiratory syncytial virus infection in infants with underlying cardiopulmonary disease. *The Journal of the American Medical Association* 254:3047.
- Hemmatzadeh F, Alinejad A. 2003. Study on proteinal pattern of isolated NDV in Iran and comparison with live vaccine strains. *Journal of Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran* 58:61-65.
- Hoshino T, Hayashi T, Hayashi K, Hamada J, Lee JB, Sankawa U. 1998. An antivirally active sulfated polysaccharide from *Sargassum horneri* (TURNER) C.AGARDH. *Biological & pharmaceutical bulletin* 21: 730-734.
- Hu X, Ray R, Compans RW. 1992. Functional interactions between the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase of human parainfluenza viruses. *Journal of Virology* 66:1528-1534.
- Iorio RM, Borgman JB, Glickman RL, Bratt MA. 1986. Genetic variation within a neutralizing domain on the haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus. *The Journal of general virology* 67:1393-1403.
- Iqbal M, Flick-Smith H, McCauley JW. 2000. Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E(rns) with cell surface glycosaminoglycans. *The Journal of general virology* 81:451-459.
- Kaleta EF, Baldauf C. 1988. Newcastle disease in free-living and pet birds. In: *Newcastle Disease* Alexander DJ. (eds). Kluwer Academic Publisher: Boston, pp.197-246.
- Kemble GW, Henis YI, White JM. 1993. GPI- and transmembrane-anchored influenza hemagglutinin differ in structure and receptor binding activity. *The Journal of cell biology* 122:1253-1265.
- Kleven SH. 1997. Report of the committee. Transmissible diseases of poultry and other avian species. *Proceedings of the 101st Annual Meeting. U.S. Animal Health Association, Louisville, Ky.* 486-491.
- Kolakofsky D, Pelet T, Garcin D, Hausmann S, Curran J, Roux L. 1998. Paramyxovirus RNA synthesis and requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited. *Journal of Virology* 72: 891-899.
- Kolender AA, Pujol CA, Damonte EB, Matulewicz MC, Cerezo AS. 1997. The system of sulfated alpha-(1->3)-linked D-mannans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*: structures, antiherpetic and anticoagulant properties. *Carbohydrate research* 304:53-60.
- Koyanagi S, Tanigawa N, Nakagawa H, Shimeno H. 2003. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. *Biochemical pharmacology* 65:173-179.

- Lamb RA. 1993. *Paramyxovirus* fusión: a hipóthesis for changes. *Virology* 197:1-11.
- Lamb RA, Kolakofsky D. 1996. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: *Fields Virology*, Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds). Raven Press, New York, pp. 1177–1204.
- Lai HY, Chen JH, Tsai PP, Ho MW, Shen WC. 2004. Hepatic Steatosis and Pancreatitis Associated with the Use of Stavudine in a Patient with HIV Infection *AJR. American journal of roentgenology* 183:1605-1607.
- Lapasin R, Pricl S. 1995. Rheology of industrial polysaccharides: theory and application. Blackie Academic and Professional: London, p. 620.
- Lee JB, Hayashi K, Hashimoto M, Nakano T, Hayashi T. 2004. Novel antiviral Fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* (Mekabu). *Chemical and pharmaceutical bulletin* 52:1091-1094.
- Lenzo NP, Garas BA, French MA. 1997. Hepatic steatosis and acidosis lactic associated with stavudine treatment in an HIV patient: a case report. *AIDS* 11:1294.
- Linchuan W, Hong Y. 1998. Identification of the infection of paramyxovirus type 1 in goose. *Proceedings, Fourth Asia Pacific Poultry Health Conference, Melbourne, November* 135.
- Luscher-Mattli M. 2000. Polyanions a lost chance in the fight against HIV and other virus diseases?. *Antiviral chemistry and chemotherapy* 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. *Journal of Leukocyte Biology* 56:266-272.
- Malhotra R, Ward M, Bright H, Priest R, Foster M, Blair E, Bird M. 2003. Isolation and characterization of potential respiratory syncytial virus receptor (s) on epithelial cells. *Microbes and infection* 5:123-133.
- Mandell CP, Reyes RA, Cho k, Sawai ET, Fang AL, Schmidt KA, LuciW PA. 1999. SIV/HIV Nef recombinant virus (SHIVnef) produces simian AIDS in rhesus macaques. *Virology* 265:235-251.
- Mastromarino P, Petruzzello R, Macchia S, Rieti S, Nicoletti R, Orsi N. 1997. Antiviral activity of natural and semisynthetic polysaccharides on the early steps of rubella virus infection. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 39:339-345.
- McFerran JB, McCracken RM. 1988. Newcastle disease. In: *Newcastle Disease*, Alexander D.J. (ed). Kluwer Academic Publisher: Boston, pp. 161-138.
- McGinnes LW, Kathryn G, Morrison TG. 2002. Newcastle Disease Virus HN Protein Alters the Conformation of the F Protein at Cell Surfaces. *Journal of Virology* 76:12622-12633.

McNeely WH. 1959. Fucoidan. In: Industrial gumas, Whistler RL. (ed). Academic Press, New York, pp. 117-125.

Menno DJ, Tran TH. 2006. Avian Influenza A (H5N1) Review. *Journal of Clinical Virology*. 35:2-13.

Meulemans G. 1988. Control by vaccination. In: Newcastle Disease Alexander DJ (ed). Kluwer Academic Publisher: Boston, pp. 318-322

Morales ME. 2008. Evaluación del efecto antiviral de fucoidán extraído de *Cladosiphon okamuranus* contra *Distemper canino* "in vitro". Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

Morrison TG, Portner A. 1991. Structure, function and intracellular processing of glycoproteins of *Paramyxoviridae*. In: The Paramyxoviruses, Kingsbury DW (ed). Plenum Press: E.U.A, pp. 347-382.

Mourau PS, Pereira MS. 1999. Searching for alternatives to heparin: sulfated fucans from marine invertebrates. *Trends in cardiovascular medicine* 9:225-232.

Muñoz-Ochoa M, Murillo-Alvarez JI, Rodríguez-Montesinos YE, Hernandez-Carmona G. 2005. Actividad anticoagulante de un grupo de algas colectadas en Baja California Sur, México. Resúmenes de VII Congreso de Ficología de Latinoamérica y el Caribe y V Reunión Iberoamericana de Ficología. La Habana, Cuba, Septiembre p. 41.

Nagaoka M, Shibata H, Kimura-Takagi I, Hashimoto S, Kimura K, Makino T, Piyama R, Ueyama S, Yokokura T. 1999. Structural study of Fucoidan from *Cladosiphon okamuranos* Tokida. *Glycoconjugate journal* 16:19-26.

Nakashima H, Tochikura T, Kobayashi N, Matsuda A, Ueda T, Yamamoto N. 1987. Effect of 3'-azido-2', 3'-dideoxythymidine (AZT) and neutralizing antibody on human immunodeficiency virus (HIV)-induced cytopathic effects: implication of giant cell formation for the spread of virus *in vivo*. *Virology* 159:169-173.

NOM-044-ZOO-1995. Proyecto de Norma Oficial Mexicana. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Campaña Nacional contra la Influenza aviar.

OIE, 2006. Organización Internacional de Epizootias. Organización Mundial de Sanidad Animal. Sanidad Animal Mundial e Informaciones Sanitarias. Paris: OIE, 2006.

Olofsson S, Bergström T. 2005. Glycoconjugate glycans as viral receptors. *Annals of Medicine* 37:154-72.

Ortega-Barria E, Boothroyd JC. 1999. A Toxoplasma lectin-like activity specific for sulfated polysaccharides is involved in host cell infection. *The Journal of biological chemistry* 274:1267-1276.

Pacheco-Ruíz I, González JA, Chee BA, Gálvez TA, Blanco BR, Zizumbo LE. 2000. Distribución y cuantificación de mantos de *Chondracanthus pectinatus* (Dawson) Aguilar L. Et Aguilar R, en la costa NW del Golfo de California. *Ciencias Marinas* 12:1.

Panda A, Huang Z, Elankumaran S, Rockemman D, Samal S. 2004. Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus. *Microbial pathogenesis* 36:1-10.

Patankar S, Oehninger S, Barnett T, Williams RL, Clark GF. 1993. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. *The Journal of biological chemistry* 268:21770-21776.

Peeters BP, De Leeuw OS, Koch G, Gielkens AL. 1999. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *Journal of Virology* 73:5001-5009.

Peña NB. 2007. Actividad antiviral de un extracto liofilizado del fruto de *Punica granatum L.* frente al virus de la Influenza. Tesis Doctoral. Facultad de Biología Universidad de la Habana.

Pérez AJ, Ramos GA. 1990. Antivirales. Consideraciones actuales. *Revista Acta Médica* 4:268-83.

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. *Carbohydrate research* 338:153-65.

Preeprame S, Hayashi K, Lee JB, Sankawa U, Hayashi T. 2001. A novel antivirally active fucan sulfate derived from an edible brown alga, *Sargassum horneri*. *Chemical and pharmaceutical bulletin* 49:484-5.

Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. 2001. *Biologia Vegetal*. Guanabara Koogan S.A: Río de Janeiro pp. 344-366.

Ray R, Compans RW. 1990. Immunochemistry of paramyxoviruses. In: *Immunochemistry of Viruses II*, Regemortel V and Neurath AR (eds). Elsevier: Amsterdam, pp. 215-236.

Reed LJ, Muench MA. 1938. Simple method of estimating 50% endpoints. *American Journal of Hygiene* 27:493-497.

Reynolds DL, Maraqa AD. 2000. Protective immunity against Newcastle disease: the role of antibodies specific to Newcastle disease virus polypeptides. *Avian Disease* 44:138-144.

Richman DD. 1992. Human immunodeficiency virus antiviral therapy In: *Infectious Diseases*, Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR (eds). WB Saunders: Boston 977-998.

Riou D, Collic-Jouault S, Pinczon du Sel D, Bosch S, Siavoshian S, Le Bert V, Tomasoni C, Sinquin C, Durand P, Roussakis C. 1996. Antitumor and antiproliferative effects of a fucan

extracted from *Ascophyllum nodosum* against a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line. *Anticancer research* 16:1213-1218.

Romanos MT, Andrada-Serpa MJ, Mourao PA, Yoneshigue-Valentin Y, Costa SS, Pereira MS, Miranda MM, Goncalves 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. *Antiviral chemistry and chemotherapy* 13:219-221.

Rous P, Murphy JB. 1911. Tumor implantations in the developing embryo. *Journal of the American Medical Association* 56: 741-742.

Sakai M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172:63-92.

Schaeffer HJ, Beauchamp L, Miranda P, Elion GB, Bauer DJ, Collins P. 1978. 9-(Hydroxyethoxymethyl)guanine activity against viruses of the herpes group. *Nature* 272:583-585.

Schaeffer DJ, Krylov VS. 2000. Anti-HIV activity of extracts and compounds from algal and cyanobacteria. *Ecotoxicology and environmental safety* 45:208-227.

Scheid A, Chopin PW. 1974. Identification of the biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion, hemolysis and infectivity by proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus. *Virology* 57:475-490.

Schneider-Schaulies J. 2000. Cellular receptors for viruses: links to tropism and pathogenesis. *Journal of general Virology* 81:1413-1429.

Seal B, King D, Bennet J. 1995. Characterization of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis. *Journal of clinical microbiology* 33:2624-2630.

SENASICA, 2005. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad agroalimentaria, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Vigilancia de la Influenza Aviar en México: Febrero, 2005.

Sergel T, Macguinnes LW, Peeples ME, Morrison TG. 1993. The attachment function of the Newcastle disease virus hemagglutininneuraminidase protein can be separated from fusion promotion by mutation. *Virology* 193:717-726.

Serkedjieva J. 2004. Antiviral activity of the red marine alga *Ceramium rubrum*. *Phytotherapy research* 8:480-3.

Shibata H, Kimura-Takagi I, Nagaoka M, Hashimoto S, Aiyama R, Iha M, Ueyama S, Yokokura T. 2000. Properties of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* tokida in gastric mucosal protection. *Biofactors* 11:235-45.

Shihmanter E, Panshin A, Lipkind M. 2005. Nucleotide sequence of the matrix protein gene of avian Paramyxovirus, serotype 3b: evidence on another member of the suggested new genus of the subfamily Paramyxovirinae. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 28:37-51.

Sierra AF, Torres PD. 2004. Enfermedad hepática tóxica inducida por drogas: Revisión sistemática estructurada. *Annals of Hepatology* 3:10-25.

Steward M, Vipond IB, Millar NS, Emerson PT. 1993. RNA editing in Newcastle disease virus. *The Journal of general virology* 74:2539-2547.

Suarez DL, Schultz-Cherry S. 2000. Immunology of avian influenza virus: a review. *Developmental and comparative Immunology* 24:269-238.

Svenda M, Berg M, Moreno-Lopez J, Linne T. 1997. Analysis of the large (L) protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: identification of possible functional domains. *Virus Research* 48:57-70.

Swayne DE, King DJ. 2003. Avian Influenza and Newcastle Disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 222:1534-1540.

Takahashi Y, Uehara K, Watanabe R, Okamura T, Yamashita T, Omura H, Yomo Toshikatsu, 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. In: *Advances in shrimp biotechnology*, Flegel TW (ed). National Center for Genetic Engineering and Biotechnology: Bangkok, pp. 171-174.

Tako M, Yoza E, Tohma S. 2000. Chemical characterization of acetyl fucoidan and alginate from commercially cultured *Cladosiphon okamuranus*. *Botanica Marina, Walter de Gruyter* 43:393-398.

Tohma T. 1988. In: *Sangoshoiki no Zoyoushyoku*, Shokita S (ed). Midori Shobou: Tokyo, p. 84.

UNA. 2005. Compendio de indicadores económicos del sector avícola 2004-2005. Dirección de Estudios Económicos. México: UNA, p. 110.

Vagnozzi A, Carrillo C. 2006. Análisis comparativo del gen P de Rinderpest Virus (RPV). *Investigación Veterinaria* 8:67-91.

Villegas P. 1998. Viral diseases of the respiratory system. *Poultry Science* 77:1143-1145.

White JM. 1990. Viral and cellular membrane fusion proteins. *Annual review of physiology* 52:675-697.

White D, Fenner F. 1994. Chemotherapy of viral diseases. In: *Medical Virology*, White D and Fenner F (eds). Academic Press L: Chicago, pp. 266-281.

Wilde A, McQuain C, Morrison TG. 1986. Identification of the sequence content of four polycistronic transcripts synthesized in Newcastle disease virus infected cells. *Virus Research* 5:77-95.

Witvrouw M, Pannecouque C, De Clerq E. 1997. In: *Carbohydrates in drug design*, Witczak ZJ and Nieforth KA (eds). Marcel Dekker, Inc: New York, pp. 157-207.

Zhu J, Jiang X, Liu Y, Tien P, Gao GF. 2005. Design and characterization of viral polypeptide inhibitors targeting Newcastle Disease virus fusion. *Journal of molecular biology* 354:601-613.