USO DEL PACAP PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES VIRALES EN ORGANISMOS ACUATICOS

Campo de la técnica

La presente invención se relaciona con el campo de la biotecnología acuática, en particular con el uso del PACAP y de composiciones que contengan PACAP para el tratamiento de infecciones virales, o enfermedades infecciosas causadas por virus, en organismos acuáticos. También se relaciona con el uso del PACAP combinado con antivirales para el tratamiento de dichas infecciones.

Estado de la técnica anterior

La contribución anual del cultivo de especies acuáticas a la producción total de peces, moluscos y crustáceos se ha incrementado en épocas recientes. Sin embargo, las altas densidades de los cultivos implican que estos animales vivan en condiciones de estrés, y que generalmente sean más susceptibles a las infecciones. Los brotes de enfermedades causadas por patógenos en la acuicultura resultan en grandes pérdidas económicas e incluso, en ocasiones, producen el cese de los cultivos en determinadas regiones.

En los salmónidos, las infestaciones causadas por el virus de la necrosis pancreática infecciosa (del inglés: *infectious pancreatic necrosis virus,* abreviado IPNV), el virus de la septicemia hemorrágica viral (del inglés: *viral hemorrhagic septicemia virus,* abreviado VHSV), el virus de la anemia infecciosa del salmón (del inglés: *infectious salmon anemia virus,* abreviado ISAV) y el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (del inglés: *infectious hematopoietic necrosis virus,* abreviado IHNV) son algunas de las causas de enfermedades más importantes en su cultivo (Marroquí et al. (2008). Antiviral Research 80: 332-338). Por ejemplo, se ha estimado que la producción del salmón chileno para el cierre del año 2010 caerá en un 38,7% (desde 403 000 toneladas en el año 2009 hasta 245 000 toneladas en el año 2010) como resultado de la mortalidad ocasionada por el ISAV (http://www.aqua.cl).

Por otra parte, los crustáceos representan uno de los sectores económicos más importantes en la acuicultura global, aportando más 10 billones de dólares anualmente. Los camarones en cultivo son susceptibles a una amplia variedad de patógenos que incluyen los virus. Se estima que a mediados de los 90, aproximadamente el 40% de la producción mundial (equivalente a 3 billones de

dólares) se perdió producto de las enfermedades. Los principales contribuyentes fueron las enfermedades virales, dentro de las cuales existen cinco especialmente importantes: el virus de la mancha blanca (del inglés: *white spot syndrome virus,* abreviado WSSV), el virus de la cabeza amarilla (del inglés: *yellow head virus,* abreviado YHV), virus del síndrome de Taura (del inglés: *taura syndrome virus,* abreviado TSV), virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (del inglés: *infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus,* abreviado IHNNV) y el baculovirus monodon (del inglés: *monodon baculovirus,* abreviado MBV) (revisado por Johnson et al. (2008) Vaccine 26: 4885-4992).

Los bivalvos constituyen una parte importante de la producción global de moluscos. Estos organismos al tener la característica de ser filtradores constituyen reservorios importantes de virus, por lo que su cultivo se puede enfrentar a epizootias que pongan en riesgo la producción. Se ha informado en la literatura mortalidades masivas de ostras adultas de la especie *Crassostrea angulata*, asociadas a infecciones por virus semejantes a iridovirus. Adicionalmente, se han descrito otros virus de las familias Herpesviridae, Papovaviridae, Togaviridae, Retroviridae, Reoviridae, Birnaviridae y Picornaviridae capaces de infectar cultivos de bivalvos. Sin embargo, debido a la ausencia de líneas celulares derivadas de moluscos y a la limitadas herramientas moleculares existentes para estos organismos, la virología de los bivalvos es todavía una ciencia primitiva basada fundamentalmente en estudios morfológicos y algunos pocos estudios experimentales (revisado por T. Renault and B. Novoa (2004) Aquat. Living Resour. 17: 397–409).

Los antivirales son compuestos químicos utilizados para el tratamiento de infecciones producidas por virus. Los primeros antivirales experimentales se descubrieron en la década de los 60. Estos fueron desarrollados mediante la metodología de "ensayo" y "error". Sin embargo, después de mediados de la década de los 80, el escenario cambió dramáticamente. En los últimos años se han registrado numerosas drogas antivirales novedosas, la mayoría para el tratamiento del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). No obstante, existen muchos aspectos que deben ser mejorados, debido a que estos compuestos no son siempre eficaces o bien tolerados. Por otra parte, algunas de las principales razones para refinar el diseño y aplicación de estas drogas son el surgimiento de la resistencia viral o los efectos secundarios asociados a ellas (De Clercq (2002) Nature Reviews Drug Discovery 1: 13-25). El diseño de drogas antivirales tiene como diana las

proteínas virales o las proteínas de la célula huésped. La primera estrategia da lugar a compuestos más específicos y menos tóxicos, pero con un espectro más estrecho de actividad antiviral y una mayor probabilidad de desarrollo de resistencia. La segunda estrategia permite obtener compuestos antivirales con un espectro de actividad más amplio y menor probabilidad de desarrollar resistencia, pero tiene como inconveniente una mayor probabilidad de toxicidad celular. La estrategia de elección depende de la naturaleza del virus y de las posibles dianas que se encuentren en el virus o la célula huésped (De Clercq (2002) Nature Reviews Drug Discovery 1: 13-25).

La ribavirina es un agente antiviral de amplio espectro, con actividad contra un rango amplio de virus de genoma de ADN y ARN. Es un análogo de nucleósido, el cual después de ser fosforilado intracelularmente, se convierte en un inhibidor competitivo de la inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) celular que es una enzima involucrada en la síntesis de guanosín monofosfato (GMP) (Graci y Cameron, (2006) Reviews in Medical Virology16: 49-63; Parker, (2005) Virus Research 107: 165-171). Además de la inhibición de esta enzima IMPDH, se han propuesto otros tres mecanismos para explicar la actividad antiviral de este compuesto: mediante la inhibición directa de la ARN polimerasa viral (Toltzis et al. (1988) Antimicrobial Agents and Chemotherapy 32: 492-497), inhibición de la adición de la caperuza en el extremo 5' del ARN mensajero (ARNm) viral (Goswami et al. (1979) Biochemical and Biophysical Research Communications 89: 830-836) y por la acumulación de mutaciones (Graci y Cameron, (2002) Virology 298: 175-180). Hasta el momento, no existen drogas antivirales específicas aprobadas para el tratamiento de enfermedades virales en organismos acuáticos. En Chile una subsidiaria de Diagnotec S.A. denominada Andrómaco desarrolló un antiviral para su uso en peces, denominado VIROTOP. Este antiviral se encuentra pendiente de aprobación por el Servicio Agrícola y Ganadero del país (SAG) (http://www.aqua.cl). No obstante, un número importante de compuestos han sido evaluados *in vitro* e *in vivo* (Hudson et al. (1988) Antiviral Research 9:379-385; Jashés et al. (2000) Antiviral research 45: 9-17; Kamei and Aoki, (2007) Archives of Virology 152: 861-869; LaPatra et al. (1998) Fish and Shellfish Immunology 8: 435-446; Mas et al. (2006) Antiviral Research 72: 107-115; Micol et al. (2005) Antiviral Research 66: 129-136; Moya et al. (2000) Antiviral Research 48: 125-130), mostrando varios grados de eficacia.

La administración de un análogo de la ribavirina, el 5-etinilo-1-b-D-ribofuranosilimidazol-carboxamida (EICAR), ha sido evaluada *in vivo* en larvas de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) infectadas de forma experimental con el IPNV (Moya et al. (2000) Antiviral Research 48: 125-130). El tratamiento consistió en baños diarios en una solución de 0,4 y 0,8 μg/mL de EICAR durante dos horas por 20 días. Los resultados mostraron que la sobrevida de los grupos infectados y tratados con EICAR fue similar a la sobrevida en los grupos no infectados con el virus. Se realizó un análisis de la carga viral en riñón y bazo, mediante la técnica de reverso transcripción-reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: *reverse transcription-polymerase chain reaction*, abreviado RT-PCR). Este análisis demostró una disminución de la carga viral en los animales tratados con el antiviral. De este estudio se concluyó que el EICAR es un inhibidor de la replicación del IPNV, por lo que su uso para disminuir la carga viral y evitar la mortalidad de peces constituye un instrumento beneficioso para incrementar la productividad de los cultivos. Sin embargo, el tratamiento con antivirales no es útil para la selección de reproductores, debido a que los peces infectados y tratados continúan siendo portadores del virus y pueden transmitirlo a la descendencia. No obstante, el uso de antivirales es ventajoso debido a que sin tratamiento los peces mueren y los que sobreviven sin tratamiento antiviral también constituyen portadores del virus.

Por otra parte, se ha observado que uno de los daños producidos por algunas infecciones virales es la pérdida de peso en los peces infectados (Wolf (1986) The fish viruses. En: Espinosa de los Monteros, J., Labarta, U. (Eds.), Patología en Acuicultura. Industrias gráficas, España, SL, pp. 93-95; Moya et al. (2000) Antiviral Research 48: 125-130). Esta pérdida de peso es mucho menor en los peces tratados con antivirales, lo que constituye una ventaja adicional del uso de los mismos. Este efecto ha sido más evidente en la trucha que en el salmón coho (Moya et al. (2000) Antiviral Research 48: 125-130).

El polipéptido activador de la adenilato ciclasa de pituitaria (PACAP) pertenece a la superfamilia de la secretina/glucagón/péptido intestinal vasoactivo. Este péptido se aisló por primera vez en el año 1989, a partir de hipotálamo bovino, y se demostró su capacidad de estimular la secreción de la hormona de crecimiento a través de la activación de la adenilato ciclasa y de la estimulación subsiguiente de la producción

de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) (Miyata et al (1989) Biochem Biophys Res Commun 164 567-574). El PACAP es un neuropéptido multifuncional que desempeña importantes funciones como factor hipofisiotrópico y neurotrópico, como neurotransmisor, neuromodulador y vasodilatador en los mamíferos (Arimura A. (1998) Japanese Journal of Physiology 48:301-31). Ha sido demostrada además su función en la regulación de la división celular, de la diferenciación y de la muerte celular (Sherwood et al. (2000) Endocrine Review 21: 619-670). Este péptido existe biológicamente en dos formas moleculares de 38 (PACAP38) y 27 (PACAP27) aminoácidos (Miyata et al. (1990) Biochemical and Biophysical Research Communications170:643-8). Las acciones biológicas del PACAP están mediadas por la interacción con dos tipos de receptores que pertenecen a la familia de los receptores acoplados a la adenilato ciclasa: el receptor de tipo I, que es altamente específico para el PACAP y nombrado como PAC-1, y los receptores de tipo II, que manifiestan la misma afinidad por el PACAP que por el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y que se conocen como VPAC-1 y VPAC-2 (Vaudry et al. (2000) Pharmacol Rev 52: 269-324).

El PACAP está ampliamente distribuido en el cerebro de los mamíferos, fundamentalmente en el hipotálamo, en los núcleos paraventricular y dorsamedial del tálamo, en el septum, en la corteza cerebral, en la amígdala, en el hipocampo y en el cerebelo (Montero et al. (2000) Journal of Molecular Endocrinology 25: 157-168). En los tejidos periféricos al igual que en los tejidos del sistema nervioso central, la forma molecular del PACAP que más abunda es la de 38 aminoácidos. Los estudios que se han realizado en diferentes especies de mamíferos muestran la presencia del PACAP en las gónadas (Shioda et al. (1994) Endocrinology 135: 818–825), en las glándulas adrenales (Arimura et al. (1991) Endocrinology 129: 2787-2789), en las glándulas paratiroideas (Vaudry et al. (2000) Pharmacol Rev 2000;52: 269-324), en el páncreas endocrino (Arimura y Shioda (1995) Neuroendocrinology 16: 53-88) y en el tracto gastrointestinal (Arimura et al. (1991) Endocrinology 129: 2787-2789; Vaudry et al. (2000) Pharmacol Rev 52: 269-324; Hannibal et al. (1998) Cell. Tissue. Res. 291: 65–79). Se ha descrito además la expresión del PACAP en células inmunes, aunque la expresión de este péptido y de sus receptores en células del sistema inmune de los mamíferos ha sido parcialmente esclarecida (Gaytan et al. (1994) Cell Tissue Res 276:223-7; Abad et al. (2002) NeuroImmunoModulation 10:177-86).

En mamíferos, entre los tejidos hematopoyéticos se ha observado la expresión constitutiva del receptor VPAC-1 en linfocitos de sangre periférica en humanos y en linfocitos y macrófagos murinos, mientras que la expresión del VPAC-2 es inducible en dichas células. Por otra parte, se ha observado la expresión constitutiva del receptor PAC-1 en macrófagos peritoneales de rata y en la línea celular mielomonocítica humana THP-1. Adicionalmente, se ha reportado la expresión del PACAP en timocitos, diferentes subtipos de células T, en células B, esplenocitos y en linfonodos en rata (Delgado et al. (2001) J Biol Chem 276:369-80; Pozo et al. (2003) Trends Mol Med 9:211-7).

En peces la presencia del PACAP y la expresión de su ácido ribonucleico mensajero (ARNm), se ha informado principalmente en el sistema nervioso central (especialmente en el hipotálamo, cerebro y cordón espinal) y en el sistema nervioso periférico inervando los ojos, la glándula pituitaria, el tracto respiratorio, las glándulas salivales, el tracto gastrointestinal, el tracto reproductivo, el páncreas, y el tracto urinario (Sherwood et al. (2000) Endocrine Review 21: 619-670).

En ratas, el PACAP inhibe la apoptosis espontánea de timocitos (Delgado. (1996) Blood 87: 5152–5161). El hecho de que el PACAP pueda controlar la proliferación de los timocitos sugiere que es un importante regulador de la maduración de estas células del sistema inmunológico (Delgado. (1996) Blood 87: 5152–5161).

Este péptido interviene de forma indirecta en la maduración de los linfocitos mediante la estimulación de la liberación de interleuquina 6 (IL-6) por las células foliculares de la pituitaria. La IL-6 estimula el crecimiento y la diferenciación de células B, y promueve la síntesis y secreción de inmunoglobulinas por estas células (Tatsuno et al. (1991) Endocrinology 129: 1797–1804; Yada et al. (1993) Peptides 14: 235–239).

También el péptido activa y suprime la respuesta inflamatoria mediante la regulación de la IL-6 y de la interleuquina-10 (IL-10) (Martínez et al. (1996) J Immunol 156(11):4128-36; Martínez et al. (1998) J Neuroimmunol 85(2):155-67); Martínez et al. (1998) J Leukoc Biol 63(5):591-601).

En macrófagos activados, el PACAP inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias y estimula la producción de citoquinas anti-inflamatorias, permitiendo la homeostasis del sistema inmune. Adicionalmente, reduce la expresión de las moléculas coestimulatorias B7.1/B7.2 y la subsiguiente activación de las células T

auxiliadoras (Th, del inglés *T helper*). Por otra parte, en macrófagos previamente estimulados, el PACAP inhibe, a través de sus receptores PAC-1 la producción de IL-6, suprimiendo así la inflamación (Martínez et al. (1998) J Neuroimmunol 85(2):155-67; Martínez et al. (1998) J Leukoc Biol. 1998 May;63(5):591-601). La acción inhibidora del PACAP sobre la transcripción de la IL-6 ante una intensa estimulación inflamatoria o una intoxicación ayuda a la protección tisular y a la homeostasis del sistema inmune (Martínez et al. (1998) J Neuroimmunol 85(2):155-67; Martínez et al. (1998) J Leukoc Biol. 1998 May;63(5):591-601). En contraste, en macrófagos no estimulados, el PACAP induce la expresión de B7.2 y promueve la diferenciación celular hacia un fenotipo Th2. (Delgado y Ganea (2001) Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 49(2):101-10).

De manera general, en años recientes se ha elucidado parcialmente la función del PACAP en la modulación del sistema inmune en mamíferos, demostrándose que el PACAP regula tanto el sistema inmune innato como el adquirido y modula la respuesta inmune pro- y anti-inflamatoria en estos organismos. Sin embargo, la información que existe sobre la posible modulación de la respuesta antiviral por el PACAP en estos organismos es escasa. Recientemente, se demostró que en pacientes crónicos de hepatitis B, los niveles de PACAP-38 en plasma se incrementan una vez eliminada la viremia por el tratamiento con lamivudina (Elefsiniotis et al. (2003) European Journal of Gastroenterology and Hepatology 15: 1209-1216) sugiriéndose una alteración de la respuesta inmune de células T inducida por el péptido que resulta en una remisión bioquímica e histológica de la enfermedad en el hígado de los pacientes.

En peces, los estudios sobre las funciones biológicas del PACAP *in vivo* publicados hasta el momento están relacionados fundamentalmente con la reproducción (Canosa et al. (2008) American Journal of Physiology (Regul Integr Comp Physiol) 295:1815-21), el desarrollo cerebral (Sherwood et al. (2007) Peptides 28:1680-7) y el apetito (Matsuda et al. (2005) Peptides 26:1611-6; Maruyama et al. (2006) Peptides 27:1820-6). Recientemente, se demostró la función biológica de este neuropéptido en el crecimiento y el desarrollo de diferentes especies de peces teleósteos en estadio larval (Lugo et al. (2008) Journal of Endocrinology 197:583-97).

El conocimiento sobre la función del PACAP en la modulación del sistema inmune en peces se limita a estudios realizados por nuestro grupo de trabajo en los que se demuestra que la administración mediante baños de inmersión o inyección del PACAP recombinante, aislado a partir de *Clarias gariepinus*, promueve no solo el crecimiento, sino que estimula parámetros de la inmunidad innata (producción de lisozima, metabolitos derivados del óxido nítrico y las defensas antioxidantes) y de la inmunidad adquirida (IgM), en las larvas y juveniles de los peces tratados (Carpio et al. (2008) Fish and Shellfish Immunology 25:439-45; Lugo et al. (2010) Fish and Shellfish Immunology 29:513-520). Estas propiedades del péptido se revelaron en la solicitud de patente "Neuropéptidos para el cultivo de organismos acuáticos", con número de publicación internacional WO2007/059714.

Una importante primera línea de defensa contra las infecciones virales en vertebrados lo constituye el sistema interferón (IFN) tipo I. Este sistema es activado por la inducción viral de IFNs tipo I (IFNα y IFNβ) a través del receptor para IFN-α/β, el cual desencadena la transducción de señales a través de la vía de JAK-STAT. Estas citoquinas producen un estado antiviral en la célula mediante la inducción de la expresión de proteínas con actividad antiviral como la 2',5' oligoadenilato sintetasa, la proteína quinasa R y el grupo de GTPasas denominadas proteínas Mx (Goodbourn et al. (2000) Journal of General Virology 81: 2341-2364). A partir de los resultados de investigaciones recientes se estableció que los peces teleósteos poseen un sistema IFN innato similar al de los mamíferos (Robertsen (2006) Fish and Shellfish Immunology 20: 172-191; Robertsen (2008) Fish and Shellfish Immunology 25: 351-357). Los IFNs han sido clonados de diferentes especies de peces, entre los que se encuentra el pez cebra (*Danio rerio*), el pez gato americano (*Ictalurus punctatus*) y el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Altmann et al. (2003) Journal of Virology 77: 1992-2002; Lutfalla et al. (2003) BMC Genomics 4: 29; Robertsen et al. (2003) Journal of Interferon and Citokine Research 23: 601-612; Long et al. (2006) Fish and Shellfish Immunology 21: 42-59). Adicionalmente, se han identificado varios factores reguladores del IFN y moléculas de la vía de señalización JAK-STAT en varias especies de peces, así como las proteínas Mx y otros genes estimulados por IFN. También se ha demostrado la actividad antiviral de proteínas Mx en el salmón del Atlántico y en el lenguado japonés (*Paralichtys*

olivaceus) (revisado por Robertsen (2006) Fish and Shellfish Immunology 20: 172-191).

Aunque en crustáceos no se han encontrado genes semejantes a los interferones se ha observado que moléculas como STAT, que son moléculas que se activan durante la respuesta a interferón en vertebrados, se regulan negativamente como respuesta a la infección por WSSV. La regulación negativa de STAT durante la infección viral en mamíferos antagoniza la respuesta de los IFNs tipo I (revisado por Johnson et al. (2008) Vaccine 26: 4885-4992). En bivalvos el conocimiento de la respuesta antiviral es aún más escaso. Existen algunas evidencias de actividad antiviral en la hemolinfa y se ha sugerido la presencia de un mecanismo tipo IFN (Olicarda et al. (2005) Antiviral Research 66(2-3): 147-152; Defer et al., (2009) Aquaculture 293(1-2): 1-7).

En el desarrollo de la acuicultura, es de interés obtener nuevos compuestos o composiciones que puedan ser empleados en el control de las infecciones virales, debido a las afectaciones que estas infestaciones traen a esta actividad.

Explicación de la invención

La presente invención resuelve el problema antes mencionado al proveer una nueva alternativa para el control de las infecciones virales en la acuicultura, mediante el uso del PACAP en la fabricación de composiciones para el tratamiento de infecciones virales y enfermedades infecciosas causadas por virus en organismos acuáticos.

El término "tratamiento" dentro del contexto de la presente invención se refiere a cualquier efecto beneficioso en la regresión de la enfermedad que incluye la atenuación, reducción, decremento o disminución del desarrollo patológico después del comienzo de la enfermedad.

El término "antiviral", como se usa en la presente invención, incluye cualquier molécula definida como tal en la literatura, así como cualquier análogo, derivados funcionales o fragmentos activos.

El término "polipéptido activador de la adenilato ciclasa de pituitaria (PACAP)", como se usa en la presente invención, incluye esta molécula en cualquiera de sus variantes (PACAP27 o PACAP38), aislada de su fuente natural, o de origen sintético o producido mediante la tecnología del ADN recombinante.

En una realización de la presente invención, variantes del neuropéptido PACAP solo (o en combinación con una molécula con actividad antiviral conocida) se aplican a

peces, crustáceos y bivalvos mediante baños de inmersión a intervalos de 2-3 días. Como alimento formulado, el PACAP se aplica a estos organismos como compuesto solo o en combinación con una molécula de actividad antiviral conocida. Como resultado principal se encontró que las preparaciones, administradas por baños de inmersión, inyección o por vía oral, fueron efectivas al aumentar la sobrevida de organismos acuáticos infectados con virus y tratados con dichas preparaciones. Se observó además que el peso corporal de estos organismos se mantiene igual o aumenta, en comparación con el de los organismos infectados y no tratados. El análisis de muestras de tejidos y órganos susceptibles a la infección viral mediante RT-PCR demostró, además, una disminución de la carga viral en los organismos infectados y tratados.

Hasta el momento de la presente invención no se tenía conocimiento acerca de si el PACAP modulaba o no la respuesta antiviral en peces, crustáceos y bivalvos y de los mecanismos involucrados. En la presente invención se demuestra, por primera vez, tanto *in vitro* como *in vivo* una relación entre el PACAP y la respuesta a virus en peces, crustáceos y bivalvos. Adicionalmente, se describe por primera vez un efecto positivo inesperado del PACAP sobre moléculas involucradas en la respuesta antiviral, tales como las proteínas Mx, interferón gamma (IFN γ) y TLR9 (del inglés: *toll like receptor 9*), así como una regulación diferencial de este péptido y sus receptores en células del sistema inmune de peces tratadas con virus y/o poli I:C tanto *in vitro* como *in vivo*.

El tratamiento de las infecciones virales en los peces, crustáceos y bivalvos mediante la administración del PACAP o de una combinación del PACAP con una molécula antiviral de acción conocida en peces no ha sido revelado ni sugerido previamente en el estado de la técnica.

En el contexto de la invención, la administración del PACAP y de la molécula antiviral puede ser simultánea (en una formulación única), secuencial o separada en el tiempo. Las preparaciones se administran a los organismos acuáticos por vía oral, inyección o mediante baños de inmersión.

En la presente invención se tratan peces, crustáceos y bivalvos con PACAP y con preparaciones que contienen moléculas antivirales combinadas con PACAP. Inesperadamente se observó que el neuropéptido PACAP tiene actividad antiviral en peces, crustáceos y bivalvos. Por otro lado, se demostró que la combinación del

PACAP con sustancias de actividad antiviral conocida reporta una respuesta antiviral superior (sinérgica) a la del PACAP solo, tanto *in vitro* como *in vivo*. En peces, hasta el presente, no se le habían asignado funciones biológicas al PACAP en la respuesta antiviral. Por otra parte, hasta el presente no se ha aislado el PACAP en camarones ni bivalvos, ni se ha aislado otro péptido perteneciente a la superfamilia de la secretina y el glucagón. Sólo existen evidencias experimentales informadas, de la estimulación del crecimiento en camarones por la administración exógena del PACAP recombinante de peces (solicitud de patente con número de publicación internacional WO2007/059714). Por lo tanto, hasta la presente invención no se tenía conocimiento alguno acerca de su posible relación con la respuesta a virus en crustáceos y bivalvos.

Es también objeto de esta invención una composición para el tratamiento de infecciones virales y enfermedades infecciosas causadas por virus en organismos acuáticos caracterizada porque comprende al "polipéptido activador de la adenilato ciclasa de pituitaria" (PACAP). En una materialización de la invención, el PACAP que forma parte de dicha composición se obtiene por aislamiento de su fuente natural, de forma sintética, o mediante la tecnología del ADN recombinante. La misma se administra por vía oral, por inyección, o por baños de inmersión. En una realización de la invención el PACAP es un polipéptido proveniente de peces.

La presente invención también se relaciona con una combinación veterinaria caracterizada porque comprende al "polipéptido activador de la adenilato ciclasa de pituitaria" (PACAP) y una molécula antiviral. En una materialización de la invención el antiviral es la ribavirina o un análogo de la ribavirina. Los elementos que forman parte de la combinación, el PACAP y el antiviral, se administran de forma simultánea, separada o secuencial en el curso de un mismo tratamiento. En una realización de la invención, la combinación se emplea en el tratamiento de infecciones virales y enfermedades infecciosas causadas por virus en organismos acuáticos. En estos, el PACAP y el antiviral se administran por vía oral, por inyección, o por baños de inmersión.

En una realización de la invención, en dicha combinación, el PACAP se aplica como alimento formulado, a una concentración de 50 - 750 µg/ Kg de pienso y el antiviral a una concentración de 100 a 2000 mg/ Kg de pienso. En una segunda realización de la invención, el PACAP se aplica a los peces por inyección en una concentración de 0.1-10 µg por gramo del peso corporal y el antiviral a una concentración de 1-

50 μg/g de peso, como parte de la combinación veterinaria. En otra realización de la invención, en dicha combinación, el PACAP se aplica a los peces o crustáceos por baños de inmersión en una concentración de 50-1000 μg por Litro de agua y el antiviral a una concentración de 100-2000 μg/L.

En la invención, tanto el PACAP cuando se utiliza como antiviral, como la combinación de dicho péptido con una entidad antiviral conocida, se aplican a una diversidad de organismos acuáticos. Por ejemplo, entre ellos se encuentran los salmónidos, los camarones peneidos, y los bivalvos.

La composición que comprende PACAP, así como la combinación de dicho péptido con un antiviral, son útiles en el tratamiento terapéutico de infecciones virales causadas por virus de las familias Herpesviridae, Papovaviridae, Togaviridae, Retroviridae, Reoviridae, Birnaviridae y Picornaviridae.

En la invención, tanto el PACAP cuando se utiliza como antiviral, como la combinación de dicho péptido con una entidad antiviral conocida, se utilizan para el control de infecciones causadas por el IPNV, el VHSV y el ISAV. También se emplean en el tratamiento terapéutico de infecciones virales causadas por WSSV, el YHV, el TSV, el IHNNV, y el MBV.

Es también parte de la presente invención un método para el control de las infecciones virales en la acuicultura que comprende la administración del PACAP, o de combinaciones veterinarias que comprendan PACAP, a organismos acuáticos en cultivo.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Análisis de la expresión mediante PCR a tiempo real del receptor PAC-1 en leucocitos de riñón anterior de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) tratados *in vitro* con poli I:C (30 μg/mL) o infectados con IPNV (multiplicidad de la infección (del inglés *multiplicity of infection*, abreviado m.o.i) de 0.1) a las 4, 24 y 48 horas de iniciado el experimento. Los cultivos de leucocitos se trataron por duplicado, y los niveles de expresión del receptor PAC-1 se analizaron mediante PCR cuantitativo por triplicado. Los datos se expresan como la media de la expresión relativa del PAC-1 respecto al gen endógeno de expresión constitutiva EF1 α ± desviación estándar de la media (DS). * ($p<0.05$) indica que la expresión relativa del PAC-1 fue

estadísticamente superior respecto a su expresión relativa en los cultivos de leucocitos no tratados (control negativo).

Figura 2. Análisis de la expresión mediante PCR a tiempo real del receptor PAC-1 en la línea celular de macrófagos de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) RTS-11 infectada *in vitro* con VHSV (m.o.i de 0.1) a los días 1, 4 y 8 de iniciado el experimento. El experimento se realizó por duplicado, y los niveles de expresión del receptor PAC-1 se analizaron mediante PCR cuantitativo por triplicado. Los datos se muestran como la media de la expresión relativa del PAC-1 respecto al gen endógeno de expresión constitutiva EF1 α ± desviación estándar de la media (DS). * ($p<0.05$) indica que la expresión relativa del PAC-1 fue estadísticamente inferior respecto a su expresión relativa en los cultivos de leucocitos no tratados (control negativo).

Figura 3. Análisis de la expresión mediante PCR a tiempo real del receptor VPAC-1 en leucocitos de riñón anterior de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) tratados *in vitro* con poli I:C (30 µg/mL) o infectados con VHSV (m.o.i de 0.1) a las 4, 24 y 48 horas de iniciado el experimento. El experimento se realizó por duplicado y los niveles de expresión del receptor PAC-1 se analizaron mediante PCR cuantitativo por triplicado. Los datos se muestran como la media de la expresión relativa del VPAC-1 respecto al gen endógeno de expresión constitutiva EF1 α ± desviación estándar de la media (DS). * ($p<0.05$) indica que la expresión relativa del VPAC-1 fue estadísticamente superior respecto a su expresión relativa en los cultivos de leucocitos no tratados (control negativo).

Figura 4 Análisis de la expresión mediante PCR a tiempo real del receptor PAC-1 en leucocitos de riñón anterior (A) y de bazo (B) de truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) infectadas experimentalmente *in vivo* con VHSV (100 µL de 1 x 10^7 $TCID_{50}$ (título viral del sobrenadante del cultivo) / mL por pez). Se realizaron mezclas de cinco ARNs totales de riñón anterior y de cinco ARNs totales de bazo, correspondientes a 5 peces tomados al azar de cada grupo experimental a los días 3, 7 y 10 de la infección viral. Los niveles de expresión del receptor PAC-1 se analizaron mediante PCR cuantitativo por triplicado. Los datos se expresan como la media de la expresión relativa del PAC-1 respecto al gen endógeno de expresión constitutiva EF1 α ± desviación estándar de la media (DS). * ($p<0.05$).

Figura 5. Análisis de la expresión mediante PCR a tiempo real del receptor VPAC-1 en leucocitos de riñón anterior (A) y de bazo (B) de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) infectadas experimentalmente *in vivo* con VHSV (100 µL de 1 x 10^7 $TCID_{50}$ / mL por pez). Se realizaron mezclas de cinco ARNs totales de riñón anterior y de cinco ARNs totales de bazo, correspondientes a 5 peces tomados al azar de cada grupo experimental, a los días 3, 7 y 10 de la infección viral. Los niveles de expresión del receptor VPAC-1 se analizaron mediante PCR cuantitativo por triplicado. Los datos se expresan como la media de la expresión relativa del VPAC-1 respecto al gen endógeno de expresión constitutiva EF1 α ± desviación estándar de la media (DS). * ($p<0.05$).

Figura 6. Análisis de la expresión mediante PCR a tiempo real del PACAP en leucocitos de bazo de truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) infectadas experimentalmente *in vivo* con VHSV (100 µL de 1 x 10^7 $TCID_{50}$ / mL por pez). Se realizaron mezclas de cinco ARNs totales de bazo correspondientes a 5 peces tomados al azar de cada grupo experimental, a los días 3, 7 y 10 de la infección viral. Los niveles de expresión del receptor PACAP se analizaron mediante PCR cuantitativo por triplicado. Los datos se expresan como la media de la expresión relativa del PACAP respecto al gen endógeno de expresión constitutiva EF1 α ± desviación estándar de la media (DS). * ($p<0.05$).

Figura 7. Análisis por PCR a tiempo real del efecto del PACAP38 *in vitro* sobre la transcripción de las proteínas Mx en leucocitos de sangre periférica (A) y de riñón anterior (B) de truchas sanas. Se evaluó el efecto del PACAP38 a las concentraciones de 10^{-10}, 10^{-9} y 10^{-8} M a las 48 horas de tratamiento. El experimento se repitió 4 veces. Los cultivos de leucocitos se trataron por duplicado y las reacciones de PCR se realizaron por triplicado. Los datos se expresan como la media de la expresión relativa del gen de interés (Mx) respecto al gen endógeno de expresión constitutiva EF1 α ± desviación estándar de la media (DS). * ($p<0.05$) indica que la expresión relativa del gen de interés fue estadísticamente superior respecto a su expresión relativa en los cultivos de leucocitos no tratados (control negativo).

Figura 8. Análisis por PCR a tiempo real del efecto del PACAP38 *in vitro* sobre la transcripción del IFN γ en leucocitos de sangre periférica (A) y de riñón anterior (B) de truchas sanas. Se evaluó el efecto del PACAP38 a las concentraciones de 10^{-10},

10^{-9} y 10^{-8} M a las 48 horas de tratamiento. El experimento se repitió 4 veces. Los cultivos de leucocitos se trataron por duplicado y las reacciones de PCR se realizaron por triplicado. Los datos se expresan como la media de la expresión relativa del gen de interés (IFN γ) respecto al gen endógeno de expresión constitutiva EF1 α ± desviación estándar de la media (DS). *($p<0.05$) indica que la expresión relativa del gen de interés fue estadísticamente superior, respecto a su expresión relativa en los cultivos de leucocitos no tratados (control negativo).

Figura 9. Análisis por PCR a tiempo real del efecto del PACAP38 *in vitro* sobre la transcripción de TLR9 en leucocitos (A) de sangre periférica y (B) de riñón anterior de truchas sanas. Se evaluó el efecto del PACAP38 a las concentraciones de 10^{-10}, 10^{-9} y 10^{-8} M a las 48 horas de tratamiento. El experimento se repitió 4 veces. Los cultivos de leucocitos se trataron por duplicado y las reacciones de PCR se realizaron por triplicado. Los datos se expresan como la media de la expresión relativa del gen de interés (TLR9) respecto al gen endógeno de expresión constitutiva EF1 α ± desviación estándar de la media (DS). * ($p<0.05$) indica que la expresión relativa del gen de interés fue estadísticamente superior respecto a su expresión relativa en los cultivos de leucocitos no tratados (control negativo).

Figura 10. Ensayo *in vitro* para determinar la actividad antiviral de las combinaciones PACAP-ribavirina (Rib-PACAP). A las 24 horas previo a la infección, las células fueron tratadas con el antiviral o las combinaciones PACAP-antiviral. Se estableció como control positivo células infectadas con virus, sin tratamiento antiviral (C^+) y negativos: células sin infectar y sin tratar con el antiviral (C-) y células tratadas con antiviral (Cn-Av) o las diferentes dosis de PACAP. Las células se infectaron con el inóculo viral por un periodo de 30 minutos de adsorción. Posteriormente, se lavaron con PBS y se agregaron nuevamente los diferentes tratamientos. La evaluación de la inhibición de los efectos citopáticos (CPE) se realizó empleando el método de tinción con cristal violeta (lectura de absorbancia 550 nm).

Exposición detallada de modos de realización/Ejemplos de realización

Ejemplo 1. Expresión del receptor PAC-1 en leucocitos de riñón anterior de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) tratados *in vitro* con Poli I:C e IPNV y en la línea celular de macrófagos de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) RTS-11 infectada *in vitro* con VHSV

Se utilizaron juveniles de trucha arcoiris (*O. mykiss*) de 9 a 12 gramos de peso y de 7 meses de edad, libres de VHSV e IPNV. Los peces fueron mantenidos a 14°C con recirculación del agua. La alimentación se administró dos veces al día *ad libitum*. Los virus, VHSV (cepa 0771) e IPNV (cepa Sp.) fueron propagados en la línea celular de gónadas de trucha arcoiris RTG-2 (de Sena y Rio (1975) Infect Immun 11:815-22). Las células fueron cultivadas en medio mínimo esencial (MEM, Invitrogen, USA) suplementado con 10% de suero fetal de ternero (FCS, Invitrogen) conteniendo 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. Los virus fueron inoculados en células RTG-2 crecidas en MEM con antibióticos y 2% de FCS a 14°C. Cuando se observaron efectos citopáticos extensivos, los sobrenadantes de cultivos fueron cosechados y centrifugados para eliminar los restos de células. Para realizar los experimentos se utilizaron los sobrenadantes de cultivo clarificados. Los títulos virales fueron determinados en placas de 96 pocillos según lo reportado por Reed y Muench (Reed y Muench (1998) J Hyg 27:280-9).

Se aislaron leucocitos de riñón anterior a partir de 4 truchas siguiendo el método descrito por Graham y Secombes (Graham y Secombes (1998) Immunology 65:293-7). Resumidamente, se extrajo asépticamente el riñón anterior y se pasó a través de una malla de *nylon* de 100 µm utilizando medio Leibovitz (L-15, Gibco, UK) suplementado con penicilina 100 UI/mL, estreptomicina (100 µg/mL), heparina (10 unidades/mL) y FCS al 2%. La suspensión celular resultante se colocó cuidadosamente sobre un gradiente de Percoll al 51%. El anillo de células correspondiente a los leucocitos se extrajo cuidadosamente, se lavó dos veces en L-15 conteniendo FCS al 0.1%. Las células se resuspendieron en L-15 con un 5% FCS a una concentración de $5x10^6$ células por mL y se dispensaron en placas de 24 pocillos a 1 mL por pocillo. Los leucocitos fueron expuestos a 30 µg/mL de poli I:C (Sigma) o infectados con IPNV a una m.o.i de 0.1 e incubados a 14°C por 4 horas, 24 horas y 48 horas.

Finalmente, se purificó ARN total de los cultivos de leucocitos mediante el método descrito por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski y Sacchi (1987) Anal. Biochem. 162:156-9) para evaluar los niveles de expresión del receptor PAC-1 en leucocitos no tratados y tratados con poli I:C o infectados con virus. Se trataron las muestras con una nucleasa de ácido desoxirribonucleico (ADN), específicamente con la *RQ1 RNase-free DNAse* (Promega), con el propósito de eliminar el ADN genómico que

pudiera estar presente en las muestras. Para la síntesis de los ADN complementarios (ADNc) se utilizó un juego de reactivos comercial que emplea la reverso transcriptasa *SuperScript III* (Invitrogen). Para las reacciones de PCR cuantitativas (qPCR) se utilizó una mezcla de PCR de origen comercial: *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystem). Los resultados de las qPCR se normalizaron contra un gen endógeno de expresión constitutiva, específicamente contra el factor de elongación 1 α (EF 1α) y se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como $2^{-\Delta Ct}$, donde el ΔCt equivale a la resta del valor de Ct del gen evaluado menos el valor de Ct del gen normalizador (EF 1α).

Como resultado se obtuvo que los niveles de PAC-1 se sobre-expresan en los cultivos de leucocitos tratados con poli I:C a las 4, 24 y 48 horas del experimento, lo cual sugiere que el receptor PAC-1 está involucrado en la respuesta a virus en peces, teniendo en cuenta que el poli I:C es una molécula que al ser estructuralmente igual a ARN doble cadena, produce un efecto similar al de una infección viral (muchos virus presentan genoma de ARN). Estos resultados se observan en la Figura 1. Poli I:C interactúa con el receptor tipo *toll*-3 (TLR3) que se expresa en compartimentos intracelulares de las células B y células dendríticas. El TLR-3 es estimulado en la naturaleza por virus.

Por otra parte, los niveles de expresión del PAC-1 pasaron de valores detectables en los cultivos de leucocitos no tratados a valores indetectables en los cultivos de leucocitos infectados con IPNV a las 4, 24 y 48 horas después de la infección, lo cual confirma una participación de este receptor que une específicamente a PACAP en la respuesta antiviral en peces (Figura 1). Las diferencias observadas entre el efecto del mimético viral poli I:C y el del IPNV pudieran estar asociados con un efecto específico del virus en las células infectadas, probablemente en su beneficio.

Adicionalmente, se evaluaron los niveles de expresión del PAC-1 en la línea celular de macrófagos de trucha (*O. mykiss*) RTS-11 infectada con VHSV, el procedimiento de infección viral de la línea RTS-11 fue similar al descrito anteriormente para la línea RTG-2. Igualmente, se observó una regulación negativa de los niveles de expresión del PAC-1 al día 4 y 8 posterior a la infección con VHSV (Figura 2).

Ejemplo 2. Expresión del receptor VPAC-1 en leucocitos de riñón anterior de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) tratados *in vitro* con Poli I:C y VHSV

Para evaluar los niveles de expresión del receptor VPAC-1 se llevó a cabo un diseño experimental igual al descrito en el Ejemplo 1.

Como resultado se obtuvo que los niveles de VPAC-1 se sobre-expresan en los cultivos de leucocitos tratados con poli I:C a las 4, 24 y 48 horas del experimento, lo cual sugiere que el receptor VPAC-1 al igual que el PAC-1 está involucrado en la respuesta a virus en peces, teniendo en cuenta que el poli I:C se considera una molécula mimética viral (Figura 3).

Por otra parte, los niveles de expresión del VPAC-1 fueron indetectables en los cultivos de leucocitos infectados con VHSV a las 4, 24 y 48 horas después de la infección, lo cual confirma una participación de este receptor que une a VIP y a PACAP con la misma afinidad en la respuesta antiviral en peces (Figura 3).

Al igual que lo observado con el receptor PAC-1 en cultivo de leucocitos de riñón anterior infectados con IPNV, las diferencias observadas en la regulación del VPAC-1 por el tratamiento de los leucocitos *in vitro* con poli I:C y por la infección por VHSV pudieran estar asociadas a un efecto específico del virus como entidad biológica completa en las células infectadas, probablemente en su beneficio.

Ejemplo 3. Expresión del PACAP y de los receptores PAC-1 y VPAC-1 en leucocitos de bazo y de riñón anterior de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) infectadas *in vivo* con VHSV

El VHSV (cepa 0771) fue propagado en la línea celular RTG-2 (de Sena y Rio (1975) Infect Immun 11:815-22). En resumen, los virus fueron inoculados en la línea celular RTG-2 crecida en MEM con antibióticos (100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina) y 2% de FCS a 14°C. Cuando se observaron efectos citopáticos extensivos, los sobrenadantes de cultivos fueron cosechados y centrifugados para eliminar los restos de células. Para la infección de las truchas se utilizaron los sobrenadantes de cultivo clarificados. Los títulos virales fueron determinados en placas de 96 pocillos según lo reportado por Reed y Muench (Reed y Muench (1998) J Hyg 27:280-9).

Se utilizaron juveniles de trucha arcoiris (*O. mykiss*) de 9 a 12 gramos de peso y de 7 meses de edad y libres de VHSV e IPNV. Los peces fueron mantenidos a 14°C con recirculación del agua. La alimentación se administró dos veces al día *ad libitum*. Se conformaron dos grupos experimentales de 20 truchas cada grupo, un grupo fue inyectado con solución viral (100 µL de 1 x 10^7 $TCID_{50}$ / mL por pez) y el

otro grupo (utilizado como control negativo) fue inyectado con medio de cultivo de RTG-2 no infectada con VHSV.

A los días 1, 3, 7 y 10 post-inyección, se tomaron 5 truchas al azar y fueron sacrificadas por sobre-exposición al anestésico MS-22. Posteriormente se extrajo el riñón anterior y el bazo para proceder a la purificación de ARN total de estos órganos, según el método descrito por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski y Sacchi (1987) Anal. Biochem. 162:156-9). La síntesis de ADNc y las reacciones de las PCR cuantitativas se realizaron como se describe en el Ejemplo 1.

Para las reacciones de reverso transcripción (RT), se hicieron mezclas de cinco ARNs total de cada órgano seleccionado, correspondiente a los cinco individuos de cada grupo experimental tomados al azar al día 1, 3, 7 y 10 del experimento.

Como resultado se obtuvo que en el bazo los receptores PAC-1 y VPAC-1 se sobre-expresan al día 3 post-inyección con respecto al control negativo. Los niveles de expresión son inferiores respecto al grupo control al día 10 post-inyección. En riñón anterior, los receptores PAC-1 y VPAC-1 presentan niveles de expresión inferior al del grupo control al día 1 y 3, siendo los valores de VPAC-1 al día 10 indetectables. Al día 7 ambos receptores aumentan sus niveles de expresión con respecto al grupo control negativo. Se observó además que ambos receptores presentan un patrón de expresión similar en el tiempo posterior a la infección viral (Figuras 4 y 5).

Los valores de expresión del PACAP al día 1 son inferiores respecto a los de su control negativo y al día 7 son superiores. Estos resultados se correlacionan con los de sus dos receptores PAC-1 y VPAC-1, en el sentido de que los niveles de expresión de los receptores muestran una tendencia a ser inferiores (al día 1) y superiores (al día 7) respecto al grupo control negativo. Al día 10 los valores de expresión del PACAP son inferiores respecto al grupo control negativo (Figuras 4, 5 y 6).

La variación de los niveles de expresión del PACAP y de sus receptores PAC-1 y VPAC-1 en el bazo y el riñón anterior de peces infectados experimentalmente con VHSV e IPNV demuestran la participación de ambos receptores en la respuesta antiviral en peces *in vivo*. Esto fue corroborado en experimentos de reto en los cuales se observó un efecto positivo del PACAP en la respuesta antiviral en salmónidos, al aumentar la sobrevida de peces infectados, potenciar la respuesta inmune ante la infección viral y aclarar el virus de los órganos y fluidos susceptibles a la infección viral.

Ejemplo 4. Efecto del PACAP sobre la transcripción de las proteínas Mx, IFN γ y TLR9 en leucocitos de sangre periférica y de riñón anterior de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) sanas

Se utilizaron juveniles de trucha arcoiris (*O.mykiss*) de aproximadamente 50 gramos de peso, libres de VHSV e IPNV. Los peces (*n*=5) fueron anestesiados con sal del ácido metanosulfónico (Sigma, USA) y se les extrajo asépticamente, primero sangre periférica de la vena caudal y posteriormente el riñón anterior.

Se aislaron leucocitos de sangre periférica y de riñón anterior a partir de 5 truchas de forma independiente, siguiendo el método descrito por Graham y Secombes (Graham y Secombes (1998) Immunology 65:293-7).

La sangre periférica de cada pez se diluyó 4 veces en medio Leibovitz (L-15, Gibco, UK) suplementado con penicilina 100 UI/mL, estreptomicina (100 µg/mL), heparina (10 unidades/mL) y FCS al 2%, y se colocó cuidadosamente sobre un gradiente de Percoll al 51%. El anillo de células correspondiente a los leucocitos se extrajo cuidadosamente, se lavó dos veces en L-15 conteniendo FCS al 0.1%.

El riñón anterior se pasó a través de una malla de *nylon* de 100 µm utilizando medio Leibovitz (L-15, Gibco, UK) suplementado con penicilina 100 UI/mL, estreptomicina (100 µg/mL), heparina (10 unidades/mL) y FCS al 2%. La suspensión celular resultante se llevó a una dilución 1:4 en el mismo medio L-15 suplementado y se colocó cuidadosamente sobre un gradiente de Percoll al 51%. El anillo de células correspondiente a los leucocitos se extrajo cuidadosamente, se lavó dos veces en L-15 conteniendo FCS al 0.1%.

Las células se resuspendieron en L-15 con un 5% FCS a una concentración de $5x10^6$ células por mL y se dispensaron en placas de 24 pocillos a 1 mL por pocillo. Los leucocitos fueron tratados con 3 dosis de PACAP38 de *Clarias gariepinus* obtenido por síntesis química (10^{-10} M, 10^{-9} M y 10^{-8} M) por duplicado y se utilizó como control negativo leucocitos no tratados dispensados por duplicado.

Los niveles de Mx, IFN γ y TLR9 se evaluaron 48 horas después de los tratamientos. Para ello se purificó ARN total de los cultivos de leucocitos controles y tratados con PACAP a los tiempos mencionados anteriormente, mediante el método descrito por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski y Sacchi (1987) Anal. Biochem. 162:156-9).

Teniendo en cuenta que los cebadores diseñados para amplificar Mx, IFN γ y TLR9 no discriminan entre ADNc y ADN genómico, se trataron los ARNs total purificados a

partir de los diferentes tejidos con una nucleasa de ADN, específicamente con la *RQ1 RNase-free DNAse* (Promega) con el propósito de eliminar el ADN genómico que pudiera estar presente en las muestras.

Para la síntesis de los ADNc se utilizó un juego de reactivos comercial que emplea la reverso transcriptasa *SuperScript III* (Invitrogen). Finalmente para las reacciones de PCR cuantitativas (qPCR) se utilizó una mezcla de PCR de origen comercial: *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystem). Los resultados de las qPCR se normalizaron contra un gen endógeno de expresión constitutiva, específicamente contra el factor de elongación 1 α (EF 1α) y se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como $2^{-\Delta Ct}$, donde el ΔCt equivale a la resta del valor de Ct del gen evaluado menos el valor de Ct del gen normalizador (EF 1α).

Los niveles de las proteínas Mx aumentan después de 48 horas de tratamiento en los cultivos de leucocitos de sangre periférica tratados con 10^{-10} M de PACAP38. A la dosis de 10^{-9} M, se observa también un efecto estimulador de PACAP38 sobre la trascripción de las proteínas Mx respecto al control negativo, pero los niveles de expresión detectados fueron inferiores a los niveles obtenidos con la dosis de 10^{-10} M. A la dosis de 10^{-8} M no hubo diferencias en los niveles de expresión de las proteínas Mx respecto al control negativo. Estos resultados muestran un efecto positivo de PACAP38 sobre la trascripción de las proteínas Mx a concentraciones bajas en el rango de (10^{-9} -10^{-10} M) (Figura 7 A). En leucocitos de riñón anterior, el efecto del PACAP 38 sobre las proteínas Mx es más moderado que en leucocitos de sangre periférica, observándose un efecto estimulador a la dosis de 10^{-9} M (Figura 7B).

Adicionalmente, se observó un efecto estimulador del PACAP38 sobre la expresión del TLR9, pasando de valores indetectables de TLR9 en los cultivos de leucocitos de sangre periférica no estimulados con PACAP a valores detectables en los cultivos estimulados con PACAP38 en el rango (10^{-10}-10^{-8} M). Se obtuvieron los mayores valores a la dosis de 10^{-10} M (Figura 8 A). En leucocitos de riñón anterior, al igual que lo observado con la expresión de las proteínas Mx, el efecto fue más moderado, observando niveles de expresión de TLR9 estadísticamente superiores al control negativo a la dosis intermedia de 10^{-9} M (Figura 8 B).

Los niveles de INF γ pasaron de valores indetectables en los cultivos de leucocitos de sangre periférica control negativo a valores detectables en los cultivos tratados con las 3 dosis de PACAP38, obteniéndose los mayores niveles de expresión a la dosis intermedia de 10^{-9} M (Figura 9 A). Por otra parte, se observó que el PACAP38 estimula la trascripción del INF γ en cultivo de leucocitos de riñón anterior. Los niveles de expresión de INF γ fueron estadísticamente superiores respecto al grupo control a las dosis de 10^{-9}-10^{-8} M, obteniéndose los mejores resultados a la dosis mas alta de 10^{-8} M (Figura 9 B).

Ejemplo 5. Efecto *in vitro* de la administración del PACAP en combinación con la ribavirina sobre el IPNV

Como aislado viral, se utilizó un sobrenadante de IPNV obtenido a partir del cultivo celular (ATCC cepa VR-299). La confirmación viral fue realizada a través de un PCR específico. Se utilizó la línea celular CHSE-214 (*Chinook salmon embryo)* (ECACC n°00/F/031). Ésta fue mantenida a 18°C en medio MEM suplementado con sales de Eagle, 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM de glutamina y antibióticos.

El inóculo se creció a 15°C y 2% de SFB y previo al ensayo fue titulado mediante la técnica de Reed and Muench, (Reed y Muench (1938) The American Journal of Hygiene 27: 493-497), determinándose el título viral del sobrenadante del cultivo ($TCID_{50}$). Del inóculo viral se preparó una dilución de 0.1 m.o.i. para el ensayo. Se prepararon placas de 96 pocillos sembradas con CHSE-214 mantenida a 18°C en MEM (con sales de Eagle) y suplementada con 10% de SFB, 2 mM de glutamina y antibióticos. Se evaluaron diferentes concentraciones de ribavirina y 3 concentraciones diferentes de PACAP (0.1, 1 y 10 mM). A las 24 horas previo a la infección, las células fueron tratadas con el antiviral o las combinaciones PACAP-antiviral, estableciendo controles positivos (células infectadas con virus, sin tratamiento antiviral) y negativos (células sin infectar y sin tratar con el antiviral y células tratadas con antiviral o las diferentes dosis de PACAP y no infectadas). Las células se infectaron con el inóculo viral por un período de 30 minutos de adsorción. Posteriormente se lavaron con PBS y se agregaron nuevamente los diferentes tratamientos diluidos en MEM suplementado con SFB al 2% y antibióticos. El ensayo finalizó una vez observado el efecto citopático (CPE) en el control positivo. La evaluación se realizó por microscopía y tinción con cristal violeta (lectura de absorbancia 550 nm). El CPE en el control positivo se observó a los 3 días post-

infección, por lo tanto el ensayo se dió por finalizado. Los resultados de la inhibición de los CPE respecto al control infectado y no tratado obtenidos a partir de los valores de absorbancia de la tinción con cristal violeta se muestran en la Figura 10. El análisis de la actividad antiviral de la ribavirina en combinación con el PACAP se realizó utilizando el programa Calcusyn for Windows (Biosoft). El valor del índice de combinación de Chou obtenido mostró sinergismo entre ambas drogas para los valores de concentración ensayados.

Ejemplo 6. Efecto de la administración del PACAP y de la combinación PACAP más ribavirina a trucha arcoiris (*O. mykiss*) infectadas experimentalmente con IPNV

Se realizó un experimento para evaluar el efecto de la administración del PACAP y de la combinación PACAP-ribavirina a trucha arcoiris infectadas experimentalmente con IPNV. Se conformaron 8 grupos experimentales de 50 peces de 1.6 ± 0.4 g cada uno y se mantuvieron en agua a 10-12 °C:

Grupo 1: Peces sin tratar, no expuesto al virus

Grupo 2: Peces sin tratar, expuestos al virus

Grupo 3: Grupo tratado con ribavirina a una dosis de 400 μg/L de agua, expuestos al virus

Grupo 4: Grupo tratado con ribavirina a una dosis de 800 μg/L de agua, expuestos al virus

Grupo 5: Grupo tratado con PACAP a una dosis de 100 μg/L de agua, expuestos al virus

Grupo 6: Grupo tratado con PACAP a una dosis de 200 μg/L de agua, expuestos al virus

Grupo 7: Grupo tratado con la combinación 1 (ribavirina 400 μg/L-PACAP 100 μg/L), expuestos al virus

Grupo 8: Grupo tratado con la combinación 2 (ribavirina 800 μg/L–PACAP 200 μg/L), expuestos al virus

Los peces se alimentaron con una cantidad de pienso equivalente al 3% de la biomasa total por grupo, dos veces al día. Los peces fueron expuestos al virus colocándolos en agua a 10-12°C conteniendo aproximadamente 10^5 unidades formadoras de placas (pfu)/mL de IPNV (ATCC cepa VR-299) por 2 h. Los peces de los Grupos 1 y 2 fueron sometidos al mismo estrés del tratamiento sin el compuesto

antiviral o la combinación PACAP-antiviral. Los peces del Grupo 1 fueron sometidos a igual procedimiento con medio de cultivo celular en lugar del virus. La identificación del virus se realizó mediante RT-PCR, a partir de riñón y bazo, de acuerdo al método descrito por López-Lastra *et al.* (1994) Journal of Fish Diseases 17: 269-282. El tratamiento con el PACAP o la combinación PACAP-antiviral se realizó 3 veces a la semana durante 20 días. La primera vez se realizó 2 h después de la infección viral. Las observaciones experimentales se realizaron durante el período de los 20 días de tratamiento y los 25 días posteriores a este. Durante los 45 días del experimento se registraron las muertes y el comportamiento anormal de los peces.

Como resultado del experimento se observó que los peces infectados con IPNV y que no fueron tratados comenzaron a mostrar signos característicos de la necrosis pancreática infecciosa a partir del día 6 post-infección. La primera muerte ocurrió en el día 7 post-infección, acompañada por el agravamiento de los signos de la enfermedad en todos los peces y una alta mortalidad en los días 11, 12 y 13 post-infección. En los peces infectados y tratados con ribavirina o PACAP los signos de la enfermedad se detectaron en el día 8. Los grupos tratados con las combinaciones ribavirina-PACAP y expuestos al virus no se registraron signos de la enfermedad durante el tiempo que duró el experimento. Los peces no tratados e infectados recobraron el apetito en el día 15 post-infección. Los peces tratados con el antiviral recobraron el apetito en el día 13, mientras que los peces tratados con el PACAP y las combinaciones PACAP-ribavirina lo hicieron en el día 9 del experimento. Los peces controles no infectados mostraron un comportamiento normal y no se registró mortalidad en este grupo durante el tiempo que duró el experimento. La mortalidad acumulada en los peces no tratados e infectados con IPNV fue de 40 peces de un total de 50 (20% de sobrevida). En los peces tratados con la ribavirina e infectados la sobrevida fue de un 68-70% para los grupos 3 y 4, respectivamente. En los peces tratados con el PACAP e infectados la sobrevida fue de un 50-55% para los Grupos 5 y 6, respectivamente. En los grupos tratados con las combinaciones PACAP-ribavirina la sobrevida fue de un 97 y 99% en los Grupos 7 y 8, respectivamente. En las muestras de tejido de los peces muertos se detectó la presencia del IPNV. No se detectó el virus en las muestras tomadas de los grupos no tratados y en los no infectados.

En la Tabla 1 se muestran los pesos promedios a los 45 días post-infección. Los peces infectados y no tratados tuvieron una menor ganancia en peso en comparación a los peces no infectados. Esta pérdida de peso se compensó en los grupos tratados y en mayor medida en los grupos tratados con la combinación PACAP-ribavirina.

Tabla 1. Incremento en el peso corporal de los alevines de trucha arcoiris durante los 45 días post-infección.

Grupo experimental	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Incremento respecto al peso inicial (%)
1	1,6 ± 0,4	4,5±1,1 [a]	181
2	1,6 ± 0,4	2,7±1,2 [b]	69
3	1,6 ± 0,4	3,8±1,1 [c]	137
4	1,6 ± 0,4	3,7±1,0 [c]	131
5	1,6 ± 0,4	5,0±0,5 [d]	212
6	1,6 ± 0,4	5,2±0,6 [d]	225
7	1,6 ± 0,4	5,5±0,4 [d]	343
8	1,6 ± 0,4	5,6±0,5 [d]	350

Se realizó un ANOVA seguido de un test a posteriori de Tukey. Las letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas.

Ejemplo 7. Efecto de la administración del PACAP y de la combinación PACAP más ribavirina, formuladas en ácido poliláctido-co-glicólico, a trucha arcoiris (*O. mykiss*) infectadas experimentalmente con IPNV

Se realizó un experimento para evaluar el efecto de la administración del PACAP y de la combinación PACAP-ribavirina formuladas en ácido poliláctido-co-glicólico, Sigma (del inglés: *Poly (D-L-lactide-co-glycolic) acid,* abreviado PLGA) a truchas arcoiris infectadas experimentalmente con IPNV. Se conformaron 8 grupos experimentales de 30 peces de 30 ± 4 g cada uno y se mantuvieron en agua a 10-12 °C:

Grupo 1: Peces inyectados con PLGA, no expuesto al virus

Grupo 2: Peces inyectados con PLGA, expuestos al virus

Grupo 3: Grupo inyectado con ribavirina a una dosis de 4 µg/g de agua, expuestos al virus

Grupo 4: Grupo inyectado con ribavirina a una dosis de 8 μg/g de agua, expuestos al virus

Grupo 5: Grupo inyectado con PACAP a una dosis de 0.1 μg/g de agua, expuestos al virus

Grupo 6: Grupo inyectado con PACAP a una dosis de 0.2 μg/g de agua, expuestos al virus

Grupo 7: Grupo inyectado con la combinación 1 (ribavirina 4 μg/g-PACAP 0.1 μg/g), expuestos al virus

Grupo 8: Grupo inyectado con la combinación 2 (ribavirina 8 μg/g–PACAP 0.2 μg/g), expuestos al virus

Las nanopartículas que contienen PACAP, o la combinación PACAP más ribavirina, fueron administradas mediante inyección intraperitoneal, 2 horas posterior a la infección viral. Las observaciones experimentales se realizaron durante 30 días. Se obtuvieron resultados similares de sobrevida a los descritos en el Ejemplo 6.

Ejemplo 8. Efecto de la administración del PACAP y de la combinación PACAP más ribavirina a Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) infectado experimentalmente con IPNV

Se realizó un experimento para evaluar el efecto del la administración del PACAP y de la combinación PACAP-ribavirina a salmones (*Salmo salar*) infectados experimentalmente con IPNV. Se conformaron 8 grupos experimentales de 50 peces de 1.2 ± 0.3 g cada uno y se mantuvieron en agua a 10-12 °C:

Grupo 1: Peces sin tratar, no expuesto al virus

Grupo 2: Peces sin tratar, expuestos al virus

Grupo 3: Grupo tratado con ribavirina a una dosis de 400 μg/L de agua, expuestos al virus

Grupo 4: Grupo tratado con ribavirina a una dosis de 800 μg/L de agua, expuestos al virus

Grupo 5: Grupo tratado con PACAP a una dosis de 100 μg/L de agua, expuestos al virus

Grupo 6: Grupo tratado con PACAP a una dosis de 200 μg/L de agua, expuestos al virus

Grupo 7: Grupo tratado con la combinación ribavirina 400 μg/L-PACAP 100 μg/L, expuestos al virus

Grupo 8: Grupo tratado con la combinación ribavirina 800 μg/L–PACAP 200 μg/L, expuestos al virus

Los peces se alimentaron con una cantidad de pienso equivalente al 3% de la biomasa total por grupo, dos veces al día. Los peces fueron expuestos al virus colocándolos en agua a 10-12°C conteniendo aproximadamente 10^5 pfu/mL de IPNV (ATCC cepa VR-299) por 2 h. El tratamiento se realizó 3 veces a la semana durante 20 días. Las observaciones experimentales se realizaron durante este periodo y los 25 días posteriores al tratamiento. Durante los 45 días del experimento se registraron las muertes y el comportamiento anormal de los peces. Los peces de los Grupos 1 y 2 fueron sometidos al mismo estrés del tratamiento sin el compuesto antiviral o la combinación PACAP-antiviral. Los peces del Grupo 1 fueron sometidos a igual procedimiento con medio de cultivo celular en lugar del virus. La identificación del virus se realizó mediante RT-PCR, a partir de riñón y bazo, de acuerdo al método descrito por López-Lastra et al. (1994) Journal of Fish Diseases 17: 269-282.

Como resultado del experimento se observó que los peces infectados con el IPNV y que no fueron tratados comenzaron a mostrar signos característicos de la necrosis pancreática infecciosa a partir del día 6 post-infección. La primera muerte ocurrió en el día 8 post-infección, acompañada por el agravamiento de los signos de la enfermedad en todos los peces y una alta mortalidad entre los días 11-15 post-infección. El porciento de sobrevida en este grupo fue de un 30%. Se observó una pérdida del apetito en los días 10 y 11 en todos los grupos infectados con el virus, con la excepción de los grupos tratados con el PACAP, la combinación PACAP-ribavirina y el grupo no infectado. En los peces infectados y tratados con ambas dosis de ribavirina los primeros signos de la enfermedad se detectaron en el día 10 y se registró un 70-76% de sobrevida para la dosis menor y mayor respectivamente. En los peces infectados y tratados con el PACAP se registró un 56-60% de sobrevida para la dosis menor y mayor respectivamente. En los grupo tratados con las combinaciones ribavirina-PACAP y expuestos al virus se registró un 96-98% de sobrevida. En el grupo no infectado y no tratado el porciento de sobrevida fue de un 98%. En las muestras de tejido de los peces muertos se detectó la presencia del IPNV.

En la Tabla 2 se muestran los pesos promedios a los 45 días post-infección. Los peces infectados y no tratados tuvieron una menor ganancia en peso en comparación a los peces no infectados. Esta pérdida de peso se compensó en los grupos tratados y en mayor medida en los grupos tratados con el PACAP y con las combinaciones PACAP-ribavirina.

Tabla 2. Incremento en el peso corporal de los alevines de salmón del Atlántico durante los 45 días post-infección.

Grupo experimental	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Incremento (%)
1	1,2 ± 0,3	2,5 ± 0,8 [a]	108
2	1,2 ± 0,3	2,0 ± 0,4 [b]	67
3	1,2 ± 0,3	2,2 ± 0,4 [c]	83
4	1,2 ± 0,3	2,3 ± 0,5 [c]	92
5	1,2 ± 0,3	2,4 ± 0,3 [a]	200
6	1,2 ± 0,3	2,8 ± 0,3	233
7	1,2 ± 0,3	3,1±0,2	258
8	1,2 ± 0,3	3,4±0,1	283

Se realizó un ANOVA seguido de un test a posteriori de Tukey. Las letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas.

Ejemplo 9. Efecto de la administración del PACAP y de la combinación PACAP más ribavirina a Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) infectados experimentalmente con ISAV

Se realizó un experimento para evaluar el efecto de la administración del PACAP y de la combinación PACAP-ribavirina a salmones (*Salmo salar*) infectados experimentalmente con ISAV. Se conformaron 8 grupos experimentales de 25 peces de 50 ± 10 g cada uno y se mantuvieron en agua de mar a 10-12 °C:

Grupo 1: Peces sin tratar, no expuestos al virus ISA

Grupo 2: Peces sin tratar, expuestos al virus ISA

Grupo 3: Grupo tratado con ribavirina a una dosis de 400 μg/L de agua, expuestos al virus

Grupo 4: Grupo tratado con ribavirina a una dosis de 800 µg/L de agua, expuestos al virus

Grupo 5: Grupo tratado con PACAP a una dosis de 100 µg/L de agua, expuestos al virus

Grupo 6: Grupo tratado con PACAP a una dosis de 200 µg/L de agua, expuestos al virus

Grupo 7: Grupo tratado con la combinación ribavirina 400 µg/L-PACAP 100 µg/L, expuestos al virus

Grupo 8: Grupo tratado con la combinación ribavirina 800 µg/L–PACAP 200 µg/L, expuestos al virus

Para obtener suficiente virus para los experimentos de reto se cultivaron células SHK-1 infectadas con la cepa Glesvaer (acceso No. AJ012285, Krossøy et al. (1999) Journal of Virology 73: 2136-2142) en frascos de 175 cm^2 durante 5 días.

Los peces fueron expuestos al virus mediante cohabitación con peces inyectados intraperitonealmente con 0,3 mL de medio de cultivo conteniendo aproximadamente 10^4 pfu/mL de ISAV. Los peces del Grupo 1 recibieron igual volumen de medio de cultivo. El % de mortalidad en el Grupo 1 (sin tratar, no expuesto al virus ISA) fue de un 4% y en el Grupo 2 (sin tratar expuestos al virus) fue de un 92%. En los Grupos 3 y 4 la mortalidad fue de un 52 y 36 %, respectivamente mientras que en los Grupos 5 y 6 fue de un 60 y 72% respectivamente. En los Grupos 7 y 8 tratados con la combinación PACAP-ribavirina el % de mortalidad fue de un 8 y 4%, respectivamente. En las muestras de tejido de los peces muertos se detectó la presencia del ISAV. No se detectó el virus en las muestras tomadas de los grupos no tratados y no infectados.

Ejemplo 10. Efecto de la administración del PACAP y de la combinación PACAP más amantidina a trucha arcoiris (*O. mykiss*) infectadas experimentalmente con IHNV

Se realizó un experimento para evaluar el efecto de la administración del PACAP y de la combinación PACAP-amantidina a trucha arcoiris infectadas experimentalmente con IHNV. Se conformaron 8 grupos experimentales de 50 peces de 50 ± 5 g cada uno y se mantuvieron en agua a 10-12 °C:

Grupo 1: Peces sin tratar, no expuestos al virus

Grupo 2: Peces sin tratar, expuestos al virus

Grupo 3: Grupo tratado con amantidina a una dosis de 400 μg/L de agua, expuestos al virus

Grupo 4: Grupo tratado con amantidina a una dosis de 800 μg/L de agua, expuestos al virus

Grupo 5: Grupo tratado con PACAP a una dosis de 100 μg/L de agua, expuestos al virus

Grupo 6: Grupo tratado con PACAP a una dosis de 200 μg/L de agua, expuestos al virus

Grupo 7: Grupo tratado con la combinación 1 (amantidina 400 μg/L-PACAP 100 μg/L), expuestos al virus

Grupo 8: Grupo tratado con la combinación 2 (amantidina 800 μg/L–PACAP 200 μg/L), expuestos al virus

Las condiciones experimentales fueron similares a los experimentos descritos en los ejemplos anteriores. Los peces fueron retados por inmersión con 5.9 X 10^3 pfu/ml del virus, en 20 L de agua con aeración durante 1 hora. Como resultado del experimento se obtuvo un 26% de sobrevida de los peces no tratados e infectados con IHNV. En los peces tratados con la amantidina e infectados la sobrevida fue de un 46%. En los peces tratados con el PACAP e infectados la sobrevida fue de un 36%. En los grupos tratados con las combinaciones PACAP-amantidina la sobrevida fue de un 96-98%.

Ejemplo 11. Efecto de la administración del PACAP y de la combinación PACAP más ribavirina al camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) infectado experimentalmente con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV)

Se realizó un experimento para evaluar el efecto de la administración del PACAP y de la combinación PACAP-ribavirina al camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* infectado experimentalmente con el WSSV. Se conformaron 4 grupos experimentales de 50 camarones de 5 ± 0.5 g cada uno y se mantuvieron en agua de mar a 28 °C:

Los camarones se alimentaron con una cantidad de alimento equivalente al 8% de la biomasa total por grupo, dos veces al día. Los grupos experimentales fueron los siguientes:

Grupo 1: Sin tratar, no expuestos al virus WSSV

Grupo 2: Sin tratar, expuestos al virus WSSV

Grupo 3: Tratado con ribavirina, expuestos al virus WSSV

Grupo 4: Tratado con PACAP, expuestos al virus WSSV

Grupo 5: Tratado con la combinación ribavirina-PACAP, expuestos al virus WSSV

Para el aislamiento y propagación viral se utilizó el cangrejo *Orconectes limosus*. Se purificó el WSSV a partir de la hemolinfa recién extraída, mediante centrifugación en gradiente de sucrosa, como se describió por Van Hulten y colaboradores en el 2001 (Van Hulten et al. (2001) Virology 285: 228-33). Las muestras virales fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso.

Con el objetivo de minimizar las rutas naturales de infección por WSSV y lograr un protocolo reproducible, se utilizó la vía de inmersión para provocar la infección viral experimental. Previo a la infección viral se procedió a la titulación viral y se determinó la cantidad requerida para provocar un 75% de mortalidad. Para ello los camarones fueron experimentalmente infectados con diferentes diluciones del virus durante un periodo de incubación de 7 horas.

Posterior a la infección viral los camarones fueron lavados con agua de mar libre de virus y colocados en contenedores nuevos para realizar el experimento según el diseño de grupos experimentales descrito arriba.

Los tratamientos se administraron 3 veces por semana, durante 30 días por baños de inmersión a una dosis del antiviral solo (de 500 μg/L de agua) o combinado con el PACAP, post-infección. En el caso del grupo tratado con PACAP y con la combinación ribavirina-PACAP se utilizó una dosis de PACAP de 200 μg/L de agua. Los camarones de los Grupos 1 y 2 fueron sometidos al mismo estrés del tratamiento. Durante los 30 días del experimento se registraron las muertes en cada grupo experimental.

El % de mortalidad en el Grupo 2 (sin tratar, expuesto al virus) fue de un 60%, en el Grupo 1 (sin tratar, no expuesto al virus) fue de 0%, en el Grupo 3 (tratado con ribavirina, expuesto al virus) la mortalidad fue de un 16%, mientras que en el grupo tratado con el PACAP la mortalidad fue de un 26%. En el grupo tratado con la combinación PACAP-ribavirina el % de mortalidad fue de un 2%. En las muestras de tejido de los camarones muertos se detectó la presencia del WSSV por RT-PCR.

Ejemplo 12. Efecto de la administración del PACAP y de la combinación PACAP más ribavirina a ostiones de la especie *Pecten maximus* infectados experimentalmente con IPNV

Se realizó un experimento para evaluar el efecto de la administración del PACAP y de la combinación PACAP-ribavirina a ostiones de la especie *Pecten maximus* infectados experimentalmente con IPNV. Se conformaron 8 grupos experimentales de 30 ostiones adultos cada uno y se mantuvieron en acuarios de 250 L con flujo de agua de mar filtrada a una temperatura de 10°C. No se detectó virus en muestras de hepatopáncreas colectadas previo al comienzo del experimento. Los grupos experimentales fueron:

Grupo 1: sin tratar, no expuestos al virus

Grupo 2: sin tratar, expuestos al virus

Grupo 3: Grupo tratado con ribavirina a una dosis de 400 μg/L de agua, expuestos al virus

Grupo 4: Grupo tratado con ribavirina a una dosis de 800 μg/L de agua, expuestos al virus

Grupo 5: Grupo tratado con PACAP a una dosis de 100 μg/L de agua, expuestos al virus

Grupo 6: Grupo tratado con PACAP a una dosis de 200 μg/L de agua, expuestos al virus

Grupo 7: Grupo tratado con la combinación 1 (ribavirina 400 μg/L-PACAP 100 μg/L), expuestos al virus

Grupo 8: Grupo tratado con la combinación 2 (ribavirina 800 μg/L–PACAP 200 μg/L), expuestos al virus

El tratamiento se realizó 3 veces a la semana durante 20 días. Los ostiones fueron retados mediante la exposición a 25 L de agua conteniendo 10^7 $TCID_{50}$ mL^{-1} en acuarios de 80 L. Al cabo de 6 h se comenzó el recambio de agua, a un flujo lento de 1 L/min y a las 12 h se aumentó el flujo a 3 L/min.

Dos semanas después del reto se tomaron muestras de hepatopáncreas y se determinó el título viral. Los resultados mostraron una disminución de la carga viral en los animales tratados con la ribavirina y el PACAP. Esta disminución fue mayor en los grupos tratados con la combinación (Tabla 3).

Tabla 3. Título viral promedio de IPNV ($log_{10}TCID50\ g^{-1}$) en el hepatopáncreas de ostiones dos semanas después del reto. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

Grupos	Título viral
1	0
2	8.1^{a}
3	5.4^{b}
4	4.3^{b}
5	6.5^{c}
6	5.8^{c}
7	2.0^{d}
8	1.5^{d}

REIVINDICACIONES

USO DEL PACAP PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES VIRALES EN ORGANISMOS ACUATICOS

1. Uso del "polipéptido activador de la adenilato ciclasa de pituitaria" (PACAP) en la fabricación de una composición para el tratamiento de infecciones virales y enfermedades infecciosas causadas por virus en organismos acuáticos.
2. El uso de la reivindicación 1 caracterizado porque el PACAP se obtiene a) por aislamiento de su fuente natural, b) de forma sintética, o c) mediante la tecnología del ADN recombinante.
3. El uso de la reivindicación 2, caracterizado porque el PACAP es un polipéptido proveniente de peces.
4. El uso de las reivindicaciones 1 a la 3 caracterizado porque el PACAP se emplea en un organismo acuático seleccionado entre el grupo compuesto por salmónidos, camarones peneidos y bivalvos.
5. El uso de la reivindicación 1 caracterizado porque el PACAP se emplea en el tratamiento terapéutico de infecciones virales causadas por virus de las familias Herpesviridae, Papovaviridae, Togaviridae, Retroviridae, Reoviridae, Birnaviridae y Picornaviridae.
6. Una composición para el tratamiento de infecciones virales y enfermedades infecciosas causadas por virus en organismos acuáticos caracterizada porque comprende al "polipéptido activador de la adenilato ciclasa de pituitaria" (PACAP).
7. La composición de la reivindicación 6 caracterizada porque el PACAP se obtiene a) por aislamiento de su fuente natural, b) de forma sintética, o c) mediante la tecnología del ADN recombinante.
8. La composición de la reivindicación 6, caracterizada porque se administra por vía oral, por inyección, o por baños de inmersión.
9. La composición de las reivindicaciones 7 y 8, caracterizada porque el PACAP es un polipéptido proveniente de peces.
10. Combinación veterinaria caracterizada porque comprende al "polipéptido activador de la adenilato ciclasa de pituitaria" (PACAP) y una molécula antiviral.

11. La combinación de la reivindicación 10 donde el PACAP se obtiene a) por aislamiento de su fuente natural, b) de forma sintética, o c) mediante la tecnología del ADN recombinante.
12. La combinación de la reivindicación 10 donde el antiviral es la ribavirina o un análogo de la ribavirina.
13. La combinación de la reivindicación 10 donde el PACAP y el antiviral se administran de forma simultánea, separada o secuencial en el curso de un mismo tratamiento.
14. La combinación de las reivindicaciones 10 a la 13 caracterizada porque se emplea en el tratamiento de infecciones virales y enfermedades infecciosas causadas por virus en organismos acuáticos.
15. La combinación de la reivindicación 14 caracterizada porque el PACAP y el antiviral se administran por vía oral, por inyección, o por baños de inmersión.
16. La combinación de la reivindicación 10 donde la molécula antiviral es un compuesto químico aceptado farmacéuticamente para el tratamiento de infecciones virales, un análogo, un derivado funcional o un fragmento activo del mismo.
17. La combinación de la reivindicación 15 caracterizada porque el PACAP se aplica como alimento formulado, a una concentración de 50 - 750 µg/ Kg de pienso y el antiviral a una concentración de 100 a 2000 mg/ Kg de pienso.
18. La combinación de la reivindicación 15 caracterizada porque el PACAP se aplica a los peces por inyección en una concentración de 0.1-10 µg por gramo del peso corporal y el antiviral a una concentración de 1-50 µg/g de peso.
19. La combinación de la reivindicación 15 caracterizada porque el PACAP se aplica a los peces o crustáceos por baños de inmersión en una concentración de 50-1000 µg por Litro de agua y el antiviral a una concentración de 100-2000 µg/L.
20. Método para el control de las infecciones virales en la acuicultura caracterizado porque comprende la administración del PACAP, o de combinaciones veterinarias que comprendan PACAP, a organismos acuáticos en cultivo.