(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 621 332**

(51) Int. CI.:

A61K 9/08 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01)
A61K 31/7056 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)
A61P 31/22 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2011 PCT/CU2011/000008**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2012 WO12072055**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2011 E 11807854 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017 EP 2647369**

(54) Título: **PACAP para el tratamiento de infecciones virales en organismos acuáticos**

(30) Prioridad:

01.12.2010 CU 20100233

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.07.2017

(73) Titular/es:

CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA (100.0%)
Avenida 31 entre 158 y 190 Cubanacán Playa
Ciudad de La Habana 10600, CU

(72) Inventor/es:

ESTRADA GARCÍA, MARIO, PABLO;
LUGO GONZÁLEZ, JUANA, MARÍA;
CARPIO GONZÁLEZ, YAMILA y
TAFALLA PIÑEIRO, CAROLINA

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

PACAP para el tratamiento de infecciones virales en organismos acuáticos

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la biotecnología acuática, particularmente con el PACAP y composiciones que contienen el PACAP para tratar infecciones virales o enfermedades infecciosas causadas por virus en organismos acuáticos. También se relaciona con el PACAP en combinación con antivirales para tratar infecciones causadas por virus.

Antecedentes de la invención

La contribución anual del cultivo de las especies acuáticas a la producción total de pescado y marisco ha aumentado en los últimos tiempos. Sin embargo, las densidades más altas implican que estos animales viven en condiciones de estrés y, en general, son más susceptibles a las infecciones. Los brotes de enfermedades causadas por patógenos en la acuicultura resultan en grandes pérdidas económicas e incluso a veces producen la eliminación de cierto cultivo de una región específica.

En los salmónidos, las infestaciones causadas por el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV), el virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV) y el virus infeccioso de la necrosis hematopoyética (IHNV) son las principales causas de brotes de enfermedades en su cultivo (Marroquí et al. (2008) Antiviral Research 80: 332-338). Por ejemplo, se estima que la producción de salmón chileno a finales de 2010 caerá un 38,7% (de 403 000 toneladas en 2009 a 245 000 toneladas en 2010) como resultado de la mortalidad causada por el ISAV (http://www.aqua.cl). Por otra parte, los crustáceos son uno de los sectores económicos más importantes de la acuicultura mundial, contribuyendo con más de 10 mil millones anuales. Los camarones en cultivo son susceptibles a una amplia variedad de patógenos incluyendo virus. Se calcula que, a mediados de los años 90, aproximadamente el 40% de la producción mundial (equivalente a 3.000 millones de dólares EE.UU.) se perdió como consecuencia de enfermedades. Cinco virus son los principales contribuyentes a estas pérdidas: el virus del síndrome del punto blanco (WSSV), el virus de la cabeza amarilla (YHV), el virus del síndrome de taura (TSV), el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNNV) y el baculovirus monodon (MBV) (Revisado por Johnson et al. (2008) Vaccine 26: 4885-4992).

Los bivalvos son una parte importante de la producción global de mariscos. Estos organismos, que tienen la característica de alimentarse por filtración, son reservorios importantes de virus; por lo que su cultivo puede enfrentar epizootias que amenazan su producción. Se ha reportado mortalidad masiva de ostras adultas de Crassostrea angulata asociadas con infecciones virales similares al iridovirus. Además, otros virus de las familias de Herpesviridae, Papovaviridae, Togaviridae, Retroviridae, Reoviridae, Birnaviridae y Picornaviridae son capaces de infectar los cultivos de bivalvos. Sin embargo, debido a la ausencia de líneas celulares derivadas de los mariscos y a la limitación de las herramientas moleculares existentes para estos organismos, la virología bivalva sigue siendo una ciencia primitiva basada principalmente en estudios morfológicos y pocos estudios experimentales (revisados por T. Renault y B. Novoa (2004) Aquat. Living Resour. 17: 397-409).

Los fármacos antivirales son compuestos químicos utilizados para tratar infecciones causadas por virus. Los primeros antivirales experimentales fueron descubiertos a principios de los años 60. Estos se desarrollaron con base en la metodología "ensayo" y "error". Sin embargo, después de mediados de los años 80, la escena cambió dramáticamente y en los últimos años se han desarrollado y registrado muchos nuevos fármacos antivirales, principalmente para el tratamiento del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Sin embargo, dado que estos compuestos no siempre son eficaces o bien tolerados, hay muchos aspectos que se deben mejorar. Otras razones para refinar el diseño y la aplicación de estos fármacos son la aparición de resistencia viral o efectos secundarios asociados con ellos (De Clercq (2002) Nature Reviews Drug Discovery 1: 13-25). El diseño del fármaco antiviral tiene como objetivos principales las proteínas virales o las proteínas de la célula huésped. La primera estrategia conduce a compuestos más específicos y menos tóxicos, pero con un espectro más estrecho de actividad antiviral y una mayor probabilidad de desarrollar resistencia. La segunda estrategia resulta en el descubrimiento de compuestos antivirales con un espectro más amplio de actividad, con menos probabilidades de desarrollar resistencia pero con mayor probabilidad de producir toxicidad celular. La estrategia de elección depende de la naturaleza del virus y los objetivos potenciales en el virus o en las células huésped (De Clercq (2002) Nature Reviews Drug Discovery 1: 13-25).

La ribavirina es un compuesto antiviral de amplio espectro con actividad contra una amplia gama de virus de ADN y ARN. Es un análogo nucleósido que, después de la fosforilación intracelular, se convierte en un inhibidor competitivo de la inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), una enzima celular implicada en la síntesis de guanosina 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, existen otros tres mecanismos que se han propuesto para explicar la actividad antiviral de este compuesto: por inhibición directa de la polimerasa de ARN viral (Toltzis et al. (1988) Antimicrobial Agents and Chemotherapy 32: 492-497), la inhibición de la adición de la caperuza en el extremo

5' del ARN mensajero viral (ARNm) (Goswami et al. (1979) Biochemical and Biophysical Research Communications 89: 830-836) y la acumulación de mutaciones (Graci y Cameron, (2002) Virology 298: 175-180).

Hasta ahora, no hay fármacos antivirales específicos aprobados para el tratamiento de enfermedades virales en organismos acuáticos. En Chile, una filial de Diagnotec SA, llamada Andrómaco, desarrolló un nuevo compuesto antiviral llamado VIROTOP para el tratamiento de enfermedades virales en peces. Este antiviral está pendiente de aprobación por el "Servicio Agrícola y Ganadero" (SAG) (http://www.aqua.cl). Sin embargo, se ha evaluado un número significativo de compuestos in vitro e in vivo (Hudson et al. (1988) Antiviral Research 9: 379-385, Jasher et al. (2000) Antiviral Research 45: 9-17, Kamei y 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 diversos grados de efectividad.

Se ha evaluado in vivo la administración de un análogo de ribavirina, 5-etinil-1-β-D-ribofuranosilimidazol-carboxamida (EICAR) en larvas de salmón coho (Oncorhynchus kisutch) y trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss) infectadas experimentalmente con 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 por dos horas durante 20 días. Los resultados mostraron que la supervivencia de los grupos infectados y tratados con EICAR fue similar a la supervivencia en los grupos no infectados con el virus. Se realizó un análisis de la carga viral en hígado y bazo utilizando la técnica de reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR). Este análisis demostró una disminución de la carga viral en animales tratados con el antiviral. De este estudio se concluyó que EICAR es un inhibidor de la replicación del IPNV, de modo que su uso para reducir la carga viral y prevenir la mortalidad de peces es una herramienta beneficiosa para aumentar la productividad de los cultivos. Sin embargo, el tratamiento antiviral no es útil para la selección de la cría, porque los peces infectados y tratados todavía portan el virus y pueden transmitirlo a la descendencia. Por otra parte, se ha observado que uno de los daños causados 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). Una ventaja adicional del uso de antivirales es que esta pérdida de peso es mucho menor en los peces tratados. Este efecto fue más evidente en la trucha que en salmo coho (Moya et al (2000) Antiviral Research 48: 125-130).

El polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP) pertenece a la superfamilia de secretina/glucagón/péptido intestinal vasoactivo. Este péptido se aisló por primera vez del hipotálamo bovino en 1989. Se demostró su capacidad para estimular la secreción de la hormona del crecimiento mediante la activación de la adenilato ciclasa y la posterior estimulación de la producción de adenosina monofosfato (cAMP) (Miyata et al. Biochem Biophys Res Commun 164 567-574). El PACAP es un neuropéptido multifuncional que desempeña papeles importantes como neurotransmisor, neuromodulador y vasodilatador en mamíferos (Arimura A. (1998) Japanese Journal of Physiology 48: 301-31). Se ha demostrado su función en la regulación de la división celular, la diferenciación y la muerte celular (Sherwood et al. (2000) Endocrine Review 21: 619-670). Este péptido existe en dos variantes moleculares diferentes: 27 aa (PACAP27) y 38 aa (PACAP38) (Miyata et al. (1990) Biochemical and Biophysical Research Communications 170: 643-8). Los efectos del PACAP se ejercen a través de una familia de tres receptores VIP/PACAP que pertenecen al receptor secretina acoplado a las proteínas G. Los receptores VPAC-1 y VPAC-2 exhiben afinidades similares para los dos neuropéptidos, el VIP y el PACAP, mientras que el receptor PACAP (PAC-1) exhibe una mayor afinidad por el PACAP que por el VIP (Vaudry et al (2000) Pharmacol Rev 52: 269-324). El PACAP está ampliamente distribuido en el cerebro de los mamíferos, principalmente en el hipotálamo, los núcleos paraventricular y dorsamedial del tálamo, en el septo, la corteza cerebral, la amígdala, el hipocampo y el cerebelo (Montero et al. Endocrinology 25: 157-168). La variante más abundante en el sistema nervioso central y los tejidos periféricos es el PACAP38. Los estudios realizados en mamíferos mostraron también la presencia del PACAP en gónadas (Shioda et al. (1994) Endocrinology 135: 818-825), glándulas suprarrenales (Arimura et al. (1991) Endocrinology 129: 2787-2789), glándulas paratiroides (Vaudry et al (2000) Pharmacol Rev 2000; 52: 269-324), el páncreas endocrino (Arimura y Shioda (1995) Neuroendocrinology 16: 53-88) y 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).

La expresión del PACAP y sus receptores en células inmunes ha sido sólo parcialmente dilucidada (Gaytan et al. (1994) Cell Tissue Res 276:223-7; Abad et al. (2002) NeuroImmunoModulation 10:177-86). En mamíferos, se ha observado expresión constitutiva del receptor VPAC-1 en linfocitos de sangre periférica en humanos y linfocitos y macrófagos de ratones, mientras que la expresión de VPAC-2 es inducible en estas células. Además, se ha observado la expresión constitutiva del receptor PAC-1 en macrófagos peritoneales de rata y la línea de células mielomonocíticas humanas THP-1. Además, se ha reportado sobre la expresión del PACAP en timocitos, diferentes subtipos de células T, células B, esplenocitos y ganglios linfáticos en ratas (Delgado et al. (2001) J Biol Chem 276: 369-80; Pozo et al. (2003) Trends Mol Med 9:211-7).

En los peces, el PACAP se ha descrito en el sistema nervioso central (especialmente el hipotálamo, cerebro y médula espinal) y nervioso periférico, inervación de los ojos, glándula pituitaria, vías respiratorias, glándulas salivales, tracto gastrointestinal, tracto reproductivo, páncreas y tracto urinario (Sherwood et al. (2000) Endocrine Review 21: 619-670).

El PACAP inhibe la apoptosis espontánea de timocitos en ratas (Delgado. (1996) Blood 87: 5152-5161). El hecho de que el PACAP controla la proliferación de timocitos sugiere que éste péptido es un importante regulador de la maduración de las células inmunes (Delgado. (1996) Blood 87: 5152-5161).

Este péptido tiene un efecto indirecto sobre la maduración de los linfocitos mediante la estimulación de liberaciones de interleucina 6 (IL-6) por células foliculares en la pituitaria. La IL-6 estimula el crecimiento y la diferenciación de las 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). Además, el PACAP activa y suprime la respuesta inflamatoria a través de la regulación de IL-6 e IL-10 (Martinez et al. (1996) J Immunol 156 (11): 4128-36, Martinez et al. (1998) J Neuroimmunol 85(2): 155-67); Martínez et al. (1998) J Leukoc Biol 63(5): 591-601). En los macrófagos activados, el PACAP inhibe las citoquinas pro-inflamatorias y estimula la producción de citoquinas anti-inflamatorias, permitiendo la homeostasis del sistema inmunológico. Además, el PACAP reduce la expresión de las moléculas coestimuladoras B7.1/B7.2 y la posterior activación de células T colaboradoras (Th). Por otro lado, el PACAP inhibe la producción de IL-6 a través de su receptor PAC-1 en macrófagos activados, suprimiendo la inflamación (Martínez et al. (1998)J Neuroimmunol 85(2):155-67; Martinez et al. (1998) J Leukoc Biol. 1998 May; 63 (5): 591-601). La acción inhibitoria del PACAP sobre la transcripción de IL-6 en respuesta a estímulos inflamatorios intensos o a la intoxicación ayuda a la protección del tejido y a la homeostasis del sistema inmunológico (Martínez et al. (1998) J Neuroimmunol 85(2):155-67; Martínez et al. (1998) J Leukoc Biol. 1998 May; 63(5):591-601). Por el contrario, el PACAP induce la expresión de B7.2 y promueve la diferenciación celular a Th2 en macrófagos no estimulados (Delgado y Ganea (2001) Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 49(2):101-10).

En general, la función del PACAP en la modulación del sistema inmune de los mamíferos sólo se ha dilucidado parcialmente en los últimos años. Estos estudios demostraron que el PACAP regula tanto el sistema inmune innato como el adaptativo y modula la respuesta pro y antiinflamatoria. Sin embargo, la información existente sobre el efecto de éste péptido sobre la respuesta antiviral es escasa. Recientemente, se demostró en pacientes con hepatitis B crónica, un aumento en los niveles plasmáticos del PACAP-38 una vez que se eliminó la viremia como consecuencia del tratamiento con lamivudina (Elefsiniotis et al. (2003) European Journal of Gastroenterology and Hepatology 15: 1209-1216). Este hallazgo sugiere un efecto sobre la respuesta inmunitaria de las células T que da lugar a una remisión bioquímica e histológica de la enfermedad en el hígado del paciente.

En peces, los estudios in vivo sobre la función biológica del PACAP publicados hasta ahora están relacionados principalmente 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 éste neuropéptido en el crecimiento y desarrollo de diferentes larvas de especies de teleósteos (Lugo et al. (2008) Journal of Endocrinology 197:583-97).

El conocimiento sobre la función del PACAP en la modulación de la respuesta inmune de los peces se limita a los estudios realizados por nuestro grupo de investigación. Se demostró que la administración recombinante del PACAP de Clarias gariepinus por baños o inyecciones no sólo promueve el crecimiento, sino que estimula también los parámetros inmunes innatos (lisozima, metabolitos derivados del óxido nítrico y defensas antioxidantes) y la inmunidad adquirida (IgM) en larvas y juveniles tratados (Carpio et al. (2008) Fish and Shellfish Immunology 25: 439-45; Lugo et al. (2010) Fish and Shellfish Immunology 29: 513-520). Estas nuevas propiedades se describieron en la solicitud de patente "Neuropéptidos para el cultivo de organismos acuáticos" (WO2007/059714).

En los vertebrados, una de las primeras líneas de defensa contra las infecciones virales es el sistema de interferón tipo I (IFN). Este sistema se activa por inducción viral de interferones de tipo I (IFNα e IFNβ) a través del receptor IFN-α/β que desencadena la transducción de la señal mediada por JAK-STAT. Las citoquinas inducidas producen un estado antiviral celular que produce la expresión de proteínas con actividad antiviral tales como 2', 5' oligoadenilato sintetasa, quinasa R y las GTPasas Mx (Goodbourn et al. (2000) Journal of General Virology 81: 2341-2364). Recientes evidencias establecen que los peces tienen un sistema de IFN similar a los mamíferos (Robertsen (2006) Fish and Shellfish Immunology 20: 172-191; Robertsen (2008) Fish and Shellfish Immunology 25: 351-357). Los interferones han sido clonados en varias especies de peces como el pez cebra (Danio rerio), el bagre 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). Además, se han identificado varios factores reguladores de IFN, moléculas de la vía de señalización JAK-STAT, proteínas Mx y otros genes estimulados por IFN en diferentes especies de peces. Se reportó actividad antiviral mediada por proteínas Mx en Salmo salar y Paralichtys olivaceus (revisado por Robertsen (2006) Fish and Shellfish Immunology 20: 172-191).

A pesar de que hasta ahora no se han descubierto los genes similares a IFN en crustáceos, se ha observado una regulación negativa de las moléculas STAT (estas son moléculas que se activan en la respuesta de IFN en vertebrados) en respuesta a la infección por WSSV. La regulación negativa de STAT durante una infección viral antagoniza la respuesta de tipo IIFN en mamíferos (revisado por Johnson et al. (2008) Vaccine 26: 4885-4992). En los bivalvos, el conocimiento de la respuesta antiviral es aún menor. Existen evidencias de actividad antiviral en la hemolinfa de estos organismos y se ha sugerido la presencia de un mecanismo similar a IFN (Olicarda et al. (2005) Antiviral Research 66(2-3): 147-152; Defer et al., (2009) Aquaculture 293(1-2): 1-7).

En acuicultura, es de gran interés el desarrollo de nuevos compuestos o composiciones que se puedan emplear en el control de infecciones virales, debido a los daños que causan en esta actividad.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona una solución al problema descrito anteriormente proporcionando una nueva alternativa para controlar infecciones virales en 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" en el contexto de la presente invención está relacionado con cualquier efecto beneficioso en la remisión de la enfermedad que incluye la atenuación, reducción o disminución del desarrollo patológico después de la aparición de la enfermedad.

El término "antiviral", tal como se utiliza en la presente invención, incluye cualquier molécula definida como antiviral en la técnica anterior o sus análogos, derivados funcionales o fragmentos activos.

El término “Polipéptido Activador de la Adenilato Ciclasa de la Pituitaria” (PACAP), tal como se utiliza en la presente invención, incluye esta molécula en cualquier variante (PACAP27 o PACAP38), ya sea aislada de su fuente natural, o sintética, o producida por tecnología de ADN recombinante.

En una realización de la invención, las variantes del neuropéptido PACAP se administran solas o en combinación con una molécula antiviral conocida para peces, crustáceos y bivalvos, mediante baños de inmersión con intervalos de 2-3 días. Como aditivo de pienso, el PACAP también se administra solo o en combinación con una molécula antiviral conocida.

En la presente invención, se demostró que las composiciones que contenían el PACAP administradas por baños de inmersión, inyección o por vía oral, eran eficaces para aumentar la supervivencia del organismo acuático infectado por el virus y tratados con dichas composiciones. No se observó disminución en el peso de los peces tratados. En algunos casos se obtuvo un aumento de peso global en animales infectados y tratados en comparación con infectados y no tratados. El análisis de muestras de tejidos y órganos susceptibles por RT-PCR mostró una disminución en la carga viral en los animales infectados y tratados.

Hasta esta invención no se conocía si el PACAP modulaba o no la respuesta antiviral en peces, crustáceos y bivalvos y los mecanismos implicados. La presente invención demuestra, por primera vez, tanto in vitro como in vivo, una relación entre el PACAP y la respuesta al virus en peces, crustáceos y bivalvos. Además, se describe por primera vez un efecto positivo inesperado sobre las moléculas del PACAP implicadas en la respuesta antiviral, tales como la proteína Mx, el interferón gamma (IFN γ) y el receptor tipo toll 9 (TLR9), así como una regulación diferencial de este péptido y sus receptores en células del sistema inmune de peces tratados con virus y/o poli I: C, tanto in vitro como in vivo.

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

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

En la presente divulgación los peces, crustáceos y bivalvos se tratan con el PACAP y preparaciones que contienen moléculas antivirales combinadas con el PACAP. Inesperadamente, se observó que el neuropéptido PACAP tiene actividad antiviral en peces, crustáceos y bivalvos. Por otra parte, se demostró que la combinación de PACAP con sustancias con actividad antiviral conocida produce una mayor respuesta antiviral (efecto sinérgico) en comparación con el PACAP solo, tanto in vitro como in vivo. En peces, hasta el momento, no se han asignado funciones biológicas al PACAP en la respuesta antiviral. Por otra parte, hasta la fecha ni el PACAP ni otro péptido perteneciente a la superfamilia de secretina y glucagón se ha aislado en camarones o mariscos. El presente conocimiento de este péptido en estos grupos taxonómicos se basa solamente en la evidencia experimental de la estimulación del crecimiento en camarones por administración exógena de PACAP recombinante de peces (solicitud de patente internacional número de publicación WO2007/059714). Por lo tanto, hasta la presente invención, no existía ningún conocimiento acerca de su posible relación con la respuesta al virus en crustáceos y bivalvos.

Otro objeto de esta invención es una composición para el tratamiento de enfermedades virales e infecciosas causadas por virus en organismos acuáticos que comprende el "polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria" (PACAP). En una realización de la invención, el PACAP, como parte de la composición, se obtiene por aislamiento ya sea a partir de su fuente natural, sintéticamente o mediante tecnología de ADN recombinante. Se administra oralmente, por inyección o mediante baños de inmersión. En una realización de la invención el PACAP es una secuencia polipeptídica aislada de peces.

La presente invención también se refiere a una combinación veterinaria que comprende "polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria" (PACAP) y una molécula antiviral, como se define en las reivindicaciones.

En una realización de la invención, la molécula antiviral es ribavirina o un análogo de ribavirina. Los elementos que forman parte de la combinación, la molécula antiviral y el PACAP, se administran simultáneamente, por separado o secuencialmente durante el mismo tratamiento. En una realización de la invención, la combinación se utiliza en el tratamiento de enfermedades virales e infecciosas causadas por virus en organismos acuáticos. En estos, el PACAP y el antiviral se administran oralmente, por inyección o mediante baños de inmersión.

En una realización de la invención, el PACAP se aplica como pienso formulado a una concentración de 50-750 mg/kg de pienso y la molécula 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 a una concentración de 0,1-10 μg por gramo de peso corporal y el antiviral a una concentración de 1-50 μg/g, como parte de la combinación veterinaria. En otra realización de la invención en esta combinación, el PACAP se aplica a peces o crustáceos mediante baños de inmersión a una concentración de 50-1000 μg por litro de agua y la concentración del antiviral es de 100-2000 μg/L.

En la invención, tanto el PACAP cuando se usa como un antiviral, o en combinación con una molécula antiviral conocida se aplica a una variedad de organismos acuáticos. Por ejemplo, incluyen salmónidos, camarones peneidos y bivalvos.

La composición que comprende el PACAP y la combinación con una molécula 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 divulgación, tanto el PACAP cuando se utiliza como un antiviral y la combinación con una molécula antiviral, se utilizan para controlar las infecciones causadas por IPNV, VHSV e ISAV. Además, se usan en el tratamiento terapéutico de infecciones virales causadas por WSSV, YHV, TSV, IHNNV y MBV.

También es parte de la presente divulgación un método para el control de infecciones virales en el manejo de la acuicultura que comprende la administración a organismos acuáticos en cultivo del PACAP o combinaciones veterinarias que comprenden el PACAP.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Análisis de expresión por PCR en tiempo real del receptor PAC-1 en leucocitos de pronefros de trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss) tratados con poli I:C (30 μg/mL) o infectados con IPNV (multiplicidad de infección, m.o.i) de 0,1) a las 4, 24 y 48 horas desde el comienzo del experimento. Los cultivos de leucocitos se trataron por duplicado y los niveles de expresión se analizaron por qPCR en triplicado. Los datos se expresan como la media de expresión relativa de PAC-1 relacionada con el factor de elongación endógeno EF1α ± desviación estándar (DE). * ($p<0,05$).

Figura 2. Análisis de expresión por PCR en tiempo real del receptor PAC-1 en la línea celular de macrófagos de O. mykiss RTS-11 infectados in vitro con VHSV (m.o.i de 0,1) a 1, 4 y 8 horas desde el comienzo del experimento. El experimento se realizó en duplicado y los niveles de expresión se analizaron por qPCR en triplicado. Los datos se expresan como la media de la expresión relativa de PAC-1 relacionada con el factor de elongación endógeno EF1 α ± desviación estándar (DE). * ($p<0,05$).

Figura 3. Análisis de expresión mediante PCR en tiempo real del receptor VPAC-1 en leucocitos de pronefros de trucha arco iris (O. mykiss) tratados con poli I:C (30 μg/ml) o infectados con VHSV (multiplicidad de infección, m.o.i) 0,1) a las 4, 24 y 48 horas desde el comienzo del experimento. Los cultivos de leucocitos se trataron por duplicado y los niveles de expresión se analizaron por qPCR en triplicado. Los datos se expresan como la media de la expresión relativa de VPAC-1 relacionada con el factor de elongación endógeno EF1α ± desviación estándar (DE). * ($p<0,05$).

Figura 4. Análisis de expresión por PCR en tiempo real del receptor PAC-1 en leucocitos de pronefros (A) y bazo (B) de trucha arco iris (O. mykiss) infectado experimentalmente in vivo con VHSV (100 μL de $1x10^7$ TCID50 concentración viral en sobrenadante de cultivo/mL por pez). Se tomaron muestras aleatorias de cinco piscinas de ARN total de pronefros y el bazo de 5 peces a los 3, 7 y 10 días después de la infección viral. Los niveles de expresión se analizaron por triplicado mediante qPCR. Los datos se expresan como la media de la expresión relativa de PAC-1 relacionada con el factor de elongación endógeno EF1α ± desviación estándar (DE). ($p<0.05$).

Figura 5. Análisis de expresión mediante PCR en tiempo real del receptor VPAC-1 en leucocitos de pronefros (A) y bazo (B) de trucha arco iris (O. mykiss) experimentalmente in vivo infectado con VHSV (100 μL de 1 $x10^7$ TCID50/mL por pez). Se tomaron muestras aleatorias de cinco piscinas de ARN total de pronefros y el bazo de 5 peces a los 3, 7 y 10 días después de la infección viral. Los niveles de expresión se analizaron por qPCR en triplicado. Los datos se expresan como la media de la expresión relativa de VPAC-1 relacionada con el factor de elongación endógeno EF1α ± desviación estándar (DE). * ($p<0,05$).

Figura 6. Análisis de expresión mediante PCR en tiempo real del PACAP en leucocitos de bazo de trucha arco iris (O. mykiss) experimentalmente in vivo infectado con VHSV (100 μL de $1x10^7$ TCID50/mL por pez). Se tomaron muestras aleatorias de cinco piscinas de ARN total del bazo de 5 peces a los 3, 7 y 10 días después de la infección viral. Los niveles de expresión se analizaron por qPCR en triplicado. Los datos se expresan como la media de la expresión relativa de PACAP relacionada con el factor de elongación endógeno EF1α ± desviación estándar (DE). * ($p<0,05$).

Figura 7. Análisis de expresión mediante PCR en tiempo real del efecto in vitro del PACAP38 sobre la transcripción del gen codificador de proteína Mx en leucocitos de sangre periférica (A) y pronefros (B) de trucha arco iris sana. Los efectos de la administración de PACAP a una concentración de 10^{-10}, 10^{-9} y 10^{-8} M se evaluaron 48 horas después del tratamiento. El experimento se repitió 4 veces. El cultivo de leucocitos se trató por duplicado y el qPCR se realizó por triplicado. Los datos se expresan como la media de la expresión relativa de Mx relacionada con el factor de elongación endógeno EF1α ± desviación estándar (DE). * ($p<0,05$).

Figura 8. Análisis de expresión mediante PCR en tiempo real del efecto in vitro del PACAP38 sobre la transcripción del gen codificador de IFNγ en leucocitos de sangre periférica (A) y pronefros (B) de trucha arco iris sana. Los efectos de la administración de PACAP a una concentración de 10^{-10}, 10^{-9} y 10^{-8} M se evaluaron 48 horas después del tratamiento. El experimento se repitió 4 veces. El cultivo de leucocitos se trató por duplicado y el qPCR se realizó por triplicado. Los datos se expresan como la media de la expresión relativa de IFN γ relacionada con el factor de elongación endógeno EF1α ± desviación estándar (DE). * ($p<0,05$).

Figura 9. Análisis de expresión mediante PCR en tiempo real del efecto in vitro del PACAP38 sobre la transcripción del gen codificador de TLR9 en leucocitos de sangre periférica (A) y pronefros (B) de trucha arco iris sana. Los efectos de la administración del PACAP a una concentración de 10^{-10}, 10^{-9} y 10^{-8} M se evaluaron 48 horas después del tratamiento. El experimento se repitió 4 veces. El cultivo de leucocitos se trató por duplicado y el qPCR se realizó por triplicado. Los datos se expresan como la media de expresión relativa de TLR9 relacionada con el factor de elongación endógeno EF1α ± desviación estándar (DE). * ($p<0,05$).

Figura 10 Análisis in vitro para determinar la actividad antiviral de las combinaciones del PACAP y ribavirina (Rib-PACAP). A las 24 horas previo a la infección por virus, las células fueron tratadas con el "antiviral" o las combinaciones del PACAP y antivirales. Control positivo (c+): células infectadas con virus sin tratamiento antiviral. Control negativo (c-): células no infectadas y no tratadas. Las células se infectaron con virus durante 30 minutos para permitir la adsorción. Posteriormente, se lavaron con PBS y se añadieron los diferentes tratamientos. Se evaluó la inhibición de los efectos citopáticos (CPE) empleando la tinción de cristal violeta (absorbancia a 550 nm).

Ejemplos

Ejemplo 1. La expresión del receptor PAC-1 en células de leucocitos de pronefros de trucha arco iris (O. mykiss) tratadas con Poly I:C e IPNV y en la línea celular de macrófagos de trucha arco iris (O. mykiss) RTS-11 infectada con VHSV in vitro.

Se utilizó trucha arco iris juvenil (O. mykiss) de 9 a 12 gramos y 7 meses de edad, libres de VHSV e IPNV. Los peces se mantuvieron a 14 °C con circulación de agua. El alimento se administró dos veces al día ad libitum. El virus VHSV (cepa 0771) y el IPNV (cepa Sp) se propagaron en la línea de células gónadas de trucha arco iris RTG-2 (Sena y Rio (1975) Infect Immun 11:815-22). Las células se cultivaron en medio esencial mínimo (MEM, Invitrogen, EE.UU.) suplementadas con 10% de suero fetal de ternera (FCS, Invitrogen) que contenía 100 IU/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. Los virus se inocularon en células RTG-2 cultivadas en MEM con antibióticos y FCS al 2% a 14ºC. Cuando se observaron efectos citopáticos extensos, los sobrenadantes del cultivo se cosecharon y se centrifugaron para eliminar los desechos celulares. Para los experimentos se utilizaron los sobrenadantes de cultivo clarificados. Las concentraciones virales se determinaron en placas de 96 pozos según lo reportado por Reed y Muench (Reed y Muench (1998) J Hyg 27: 280-9). Los leucocitos de pronefros se aislaron de 4 truchas siguiendo el método descrito por Graham y Secombes (Graham y Secombe (1998) Immunology 65: 293-7). En resumen, el riñón anterior se retiró asépticamente y se pasó a través de una malla de nylon de 100 μ utilizando medio Leibovitz (L-15, Gibco, Reino Unido) suplementado con penicilina 100 UI/mL, estreptomicina (100 mg/mL), heparina (10 unidades/mL) y FCS al 2%. La suspensión celular resultante se colocó cuidadosamente en un gradiente de Percoll hasta el 51%. El anillo de células que corresponde a leucocitos se retiró cuidadosamente, se lavó dos veces en FCS que contenía L-15 a 0,1%. Las células se resuspendieron en L-15 con 5% de FCS a una concentración de $5x10^6$ células por ml y se dispensaron en placas de 24 pozos a 1 mL por pozo. Los leucocitos infectados se expusieron a 30 μg/mL de poli I:C (Sigma) o se infectaron con IPNV a una MOI de 0,1 y se incubaron a 14 ºC durante períodos de 4 horas, 24 horas y 48 horas. Finalmente, el ARN total se purificó a partir de cultivos de leucocitos utilizando el método descrito por 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. Las muestras se trataron con la ADNasa libre de ARNasa RQ1 (Promega), con el fin de eliminar el ADN genómico presente en las muestras. Para la síntesis de ADN complementario (cADN) se utilizó un reactivo comercial SuperScript III (Invitrogen) basado en la transcriptasa inversa. Para reacciones cuantitativas de PCR (qPCR) se utilizó una mezcla de PCR de fuentes comerciales: Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Los resultados de

qPCR se normalizaron frente a una expresión génica endógena constitutiva, específicamente el factor de elongación 1α (EF 1α) y se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como $2^{-\Delta Ct}$, donde ΔCt es igual al resto del valor del gen Ct menos el valor estimado del gen normalizador Ct (EF 1α).

El resultado fue que los niveles de PAC-1 se sobreexpresaron en leucocitos cultivados tratados con poli I:C a las 4, 24 y 48 horas del experimento, lo que sugiere que el receptor PAC-1 está implicado en la respuesta al virus en los peces, tomando en cuenta que poly I:C es una molécula que es estructuralmente la misma que el ARN de doble cadena, un efecto similar a una infección viral (muchos virus tienen genomas de ARN). Estos resultados se muestran en la Figura 1. El poli I:C interactúa con el receptor tipo toll 3 (TLR3) que se expresa en compartimentos intracelulares de células B y células dendríticas. El TLR-3 es estimulado por los virus en la naturaleza.

Por otra parte, los niveles de expresión de PAC-1 se convirtieron en valores detectables de leucocitos en cultivos no tratados a niveles indetectables en cultivos de leucocitos infectados con IPNV a las 4, 24 y 48 horas después de la infección, confirmando la participación de este receptor que se une específicamente al PACAP en la respuesta antiviral en peces (Figura 1). Las diferencias observadas entre los efectos de la mimética viral poli I:C y la del IPNV podrían estar asociadas con un efecto específico del virus en las células infectadas, probablemente para su ventaja.

Además, se evaluaron los niveles de expresión de PAC-1 en la línea celular de macrófagos RTS-11 de la trucha (O. mykiss) infectada con VHSV, el proceso de infección viral de la línea RTS-11 fue similar al descrito anteriormente para la línea RTG-2. Del mismo modo, se observó una regulación decreciente de los niveles de expresión de PAC-1 a 4 y 8 días después de la infección por VHSV (Figura 2).

Ejemplo 2. Expresión del receptor VPAC-1 en leucocitos de células de riñón anterior de trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss) tratadas con Poli I:C y VHSV

Para evaluar los niveles de expresión del receptor VPAC-1 se realizó un diseño experimental similar al descrito en el Ejemplo 1.

El resultado fue que los niveles de VPAC-1 se sobreexpresaron en leucocitos cultivados tratados con poli I:C a las 4, 24 y 48 horas del experimento, lo que sugiere que el receptor de VPAC-1 como PAC-1 está implicado 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 de VPAC-1 fueron indetectables en cultivos de leucocitos infectados con VHSV a las 4, 24 y 48 horas después de la infección, confirmando la participación de este receptor que se une al PACAP y al VIP con la misma afinidad en la respuesta antiviral en peces (Figura 3).

Como se observó con el receptor PAC-1 en leucocitos renales anteriores cultivados infectados con IPNV, las diferencias observadas en la regulación de VPAC-1 por tratamiento de leucocitos in vitro con poli I: C y la infección VHSV podrían estar asociadas con un efecto específico del virus como una entidad biológica completa en las células infectadas, probablemente para su ventaja.

Ejemplo 3. Expresión de receptores del PACAP y PAC-1 y VPAC-1 en leucocitos de bazo y riñón anterior de trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss) infectados con VHSV in vivo

El VHSV (cepa 0771) se propagó en la línea celular RTG-2 (Sena y Rio (1975) Infect Immun 11:815-22). En resumen, los virus fueron inoculados en la línea celular RTG-2 cultivada en MEM con antibióticos (100 UI/mL de penicilina y 100 ug/mL de estreptomicina) y FCS al 2% a 14 ºC. Cuando se observaron efectos citopáticos extensos, los sobrenadantes del cultivo fueron recolectados y centrifugados para eliminar los desechos celulares. Para la infección de la trucha se utilizaron sobrenadantes clarificados de cultivo. La concentración viral se determinó en placas de 96 pozos según lo reportado por Reed y Muench (Reed y Muench (1998) J Hyg 27:280-9).

Se utilizó la trucha arco iris (O. mykiss) juvenil de 9 a 12 gramos y 7 meses de edad y libre de VHSV e IPNV. Se mantuvieron los peces a 14 °C con circulación de agua. Se administró alimento dos veces al día ad libitum. Se formaron dos grupos experimentales de 20 truchas cada grupo, a un grupo se le inyectó solución de virus (100 L de $1x10^7$ TCID50/mL por pez) y el otro grupo (utilizado como control negativo) se inyectó con medio de cultivo RTG-2 no Infectado con VHSV.

En los días 1, 3, 7 y 10 después de la inyección, se tomaron 5 truchas al azar y se sacrificaron por sobreexposición al anestésico MS-22. Posteriormente, el riñón se retiró y el bazo anterior para proceder a la purificación del ARN total de estos órganos, de acuerdo con el método descrito por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski y Sacchi (1987), Anal. Biochem.162:156-9). Síntesis de CADN y reacciones de PCR cuantitativas realizadas como se describe en el Ejemplo 1.

Para las reacciones de transcripción inversa (RT), cinco ARNs totales de cinco individuos de cada grupo experimental seleccionados al azar en el día 1, 3, 7 y 10 del experimento se agruparon.

El resultado fue que en el bazo, los receptores PAC-1 y VPAC-1 se sobreexpresaron al día 3 después de la inyección en comparación con el control negativo. Los niveles de expresión son inferiores que los del grupo de control al día 10 después de la inyección. En el riñón anterior, los receptores PAC-1 y VPAC-1 tienen niveles de expresión más bajos en el grupo de control en el día 1 y 3, donde los valores de VPAC-1 a día 10 son indetectables. Al día 7 ambos receptores aumentan sus niveles de expresión en comparación con el grupo de control negativo. También se observó que ambos receptores tienen un patrón de expresión similar con el tiempo después de la infección viral (Figuras 4 y 5).

Los valores de expresión del PACAP en el día 1 son inferiores en comparación con su control negativo. El día 7 estos valores de expresión son superiores. Estos resultados se correlacionan con los de sus dos receptores VPAC-1 y PAC-1, en el sentido de que los niveles de expresión del receptor mostraron una tendencia a ser más bajos (día 1) y más altos (día 7) en comparación con el grupo de control negativo. Al día 10 la expresión de los valores del PACAP es menor comparada con el grupo de control negativo (Figuras 4, 5 y 6).

La variación en los niveles de expresión del PACAP y sus receptores PAC-1 y VPAC-1 en el bazo y riñón anterior de peces experimentalmente infectados con VHSV e IPNV demuestran la participación de ambos receptores en la respuesta antiviral in vivo en peces. Esto se confirmó en experimentos de desafío en los que se observó un efecto positivo del PACAP en la respuesta antiviral en salmónidos, aumentando la supervivencia de peces infectados, mejorando la respuesta inmune a la infección viral y despejando el virus de los órganos y fluidos capaces de realizar la replicación viral.

Ejemplo 4. Efecto del PACAP en la transcripción de proteínas Mx, IFN y TLR9 en leucocitos de sangre periférica y riñón anterior de trucha arco iris sana (Oncorhynchus mykiss)

Se utilizó la trucha arco iris juvenil (O.mykiss) de aproximadamente 50 gramos, libre de VHSV e IPNV. Los peces (n=5) se anestesiaron con sal de ácido metanosulfónico (Sigma, EE.UU.) y se recolectó asépticamente, primero sangre periférica de la vena de la cola y luego del riñón anterior.

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

La sangre periférica de cada uno de los peces se diluyó 4 veces en medio Leibovitz (L-15, Gibco, Reino Unido) suplementado con penicilina 100 UI/mL, estreptomicina (100 μg/mL), heparina (10 unidades/mL) y FCS al 2% y colocado cuidadosamente en un gradiente de Percoll al 51%. El anillo de células correspondiente a los leucocitos se retiró cuidadosamente, se lavó dos veces en L-15 que contenía FCS al 0,1%.

El riñón anterior se pasó a través de una malla de nylon de 100 μm Leibovitz (L-15, Gibco, Reino Unido) suplementado con penicilina 100 UI/mL, estreptomicina (100 μg/mL), heparina (10 unidades/mL) y FCS al 2%. La suspensión celular resultante se diluyó 1:4 en el mismo medio suplementado con L-15 y se colocó cuidadosamente en un gradiente de Percoll al 51%. El anillo de células correspondiente a los leucocitos se retiró cuidadosamente, se lavó dos veces en L-15 que contenía FCS al 0,1%.

Las células se suspendieron en L-15 con 5% de FCS a una concentración de $5x10^6$ células por ml y se dispensaron en placas de 24 pozos a 1 ml por pozo. Los leucocitos se trataron con 3 dosis del PACAP38 de Clarias gariepinus obtenidas por síntesis química (10^{-10} M, 10^{-9} M y 10^{-8} M) por duplicado y se usaron como leucocitos no tratados de control negativo dispensados por duplicado.

Los niveles de Mx, IFN y TLR9 se evaluaron 48 horas después del tratamiento. Para ello, el ARN total se purificó a partir de cultivos de leucocitos tratados con el PACAP por el método descrito por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski y Sacchi (1987), Anal. Biochem.162:156-9).

Los cebadores diseñados para amplificar Mx, IFN γ y TLR9 no discriminan entre ADNc y ADN genómico, los ARN totales fueron tratados purificados de diferentes tejidos con una ADN nucleasa, específicamente con RQ1 ADNasa libre de ARNasa (Promega) con el fin de eliminar el ADN genómico que puede estar presente en las muestras.

Para la síntesis de cADN se utilizó un kit reactivo comercial utiliza SuperScript III transcriptasa inversa (Invitrogen). Finalmente, para las reacciones cuantitativas de PCR (qPCR) se utilizó una mezcla de PCR de fuentes comerciales: Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Los resultados de qPCR se normalizaron frente a un gen de expresión constitutivo endógeno constitutivo específicamente elongación 1α (EF1α) y se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como $2^{-\Delta Ct}$, donde ΔCT es igual al resto del valor del gen Ct menos el valor estimado del gen normalizador Ct EF 1α).

Los niveles de proteína Mx aumentan después de 48 horas de tratamiento en cultivos de leucocitos de sangre periférica tratados con 10^{-10} M del PACAP38. Una dosis de 10^{-9} M, existe también un efecto estimulador del PACAP38 sobre la transcripción de proteínas Mx con respecto al control negativo, pero los niveles de expresión detectados están por debajo de los niveles obtenidos con la dosis de 10^{-10} M. Una dosis de 10^{-8} M no difirió en los niveles de expresión de la proteína Mx en relación con el control negativo. Estos resultados muestran un efecto

positivo del PACAP38 sobre la transcripción de proteínas Mx a bajas concentraciones en el intervalo de (10^{-9} -10^{-10} M)

(Figura 7A). En los leucocitos de pronefros, el efecto del PACAP 38 sobre la proteína Mx es más moderado que en leucocitos de sangre periférica, mostrando un efecto estimulante a una dosis de 10^{-9} M (Figura 7B).

Adicionalmente, se observó un efecto estimulador del PACAP38 sobre la expresión de TLR9, a partir de niveles indetectables de TLR9 en leucocitos de sangre periférica cultivados, estimulados con el PACAP a niveles detectables en cultivos estimulados con el PACAP38 en el intervalo (10^{-10}-10^{-8} M). Los valores más altos se obtuvieron a una dosis de 10^{-10} M (Figura 8 A). En los leucocitos de pronefros, como se observó previamente con la expresión de la proteína Mx, el efecto fue más moderado. Los niveles de expresión de TLR9 fueron estadísticamente más altos que el control negativo en la dosis intermedia de 10^{-9} M (Figura 8 B).

Los niveles de IFN γ fueron indetectables en cultivos no tratados de leucocitos de sangre periférica. Los cultivos tratados con 3 dosis del PACAP38, dieron como resultado niveles de expresión detectables con el nivel más alto a la dosis intermedia de 10^{-9} M (Figura 9A). Además, en los leucocitos de riñón anteriores cultivados, se observó que el PACAP38 estimula la transcripción de IFN γ. Los niveles de expresión de IFN γ fueron estadísticamente más altos que el grupo de control en dosis de 10^{-9} y 10^{-8} M, obteniendo los mejores resultados en la dosis más alta de 10^{-9} M (Figura 9 B).

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

Utilizamos sobrenadante del cultivo celular (cepa ATCC VR-299) infectado con IPNV como virus aislado. La confirmación viral se realizó a través de un PCR específico. Para los ensayos in vitro se utilizó la línea celular CHSE-214 (embrión de salmón Chinook) (ECACC Nº 00/F/031). Esto se mantuvo a 18 °C en medio MEM suplementado con sales Eagle, suero bovino fetal al 10% (FBS), 2 mM de glutamina y antibióticos.

El inóculo viral se cultivó a 15 °C y FBS al 2% y antes de los ensayos se determinó la concentración viral en el sobrenadante de cultivo (TCID 50) mediante la técnica de Reed y Muench (Reed y Muench, (1938) The American Journal of Hygiene 27: 493-497). A partir del inóculo viral se preparó una dilución de 0,1 moi. Se sembraron placas de 96 pozos con CHSE-214 mantenido a 18 °C en MEM (sales de Eagle) suplementado con FBS al 10%, 2 mM de glutamina y antibióticos. Se evaluaron diferentes concentraciones de ribavirina y 3 concentraciones diferentes del PACAP (0,1, 1 y 10 nM). A las 24 horas previas a la infección, las células se trataron con los antivirales o las combinaciones de antivirales y el PACAP, estableciendo controles positivos (células infectadas con virus sin el tratamiento antiviral) y negativas (células no infectadas y no tratadas y células no infectadas tratadas con el antiviral o con diferentes dosis del PACAP). Las células se infectaron con el inóculo viral durante un período de 30 minutos de adsorción. A continuación, las células se lavaron con PBS. Los tratamientos se diluyeron en MEM suplementado con FBS al 2% y antibióticos y se añadieron de nuevo. La prueba se concluyó una vez que se observó el efecto citopático (CPE) en el control positivo. La evaluación se realizó por microscopía y por tinción con cristal violeta (lectura de absorbancia de 550 nm). El CPE en el control positivo se observó a los 3 días después de la infección. Los resultados de la inhibición de CPE con respecto a las células de control no tratadas e infectadas, obtenidos a partir de los valores de absorbancia de la tinción con violeta de cristal, se mostraron en la Figura 10. El análisis de la actividad antiviral de la ribavirina en combinación con el PACAP se realizó usando el programa Calcusyn para Windows (Biosoft). El valor obtenido del índice de combinación de Chou mostró sinergismo entre ambos fármacos para los valores de concentración ensayados.

Ejemplo 6. Efecto de la administración del PACAP y la combinación del PACAP más ribavirina en la trucha arco iris (O. mykiss) experimentalmente infectada con IPNV

Se realizó un experimento para evaluar el efecto de la administración del PACAP y la combinación del PACAP y ribavirina en la trucha arco iris experimentalmente infectada con IPNV. Se conformaron 8 grupos experimentales de 50 peces con un peso corporal de 1,6 ± 0,4 g cada uno. La temperatura del agua se mantuvo a 10-12 °C.

Grupo 1: peces no tratados no expuestos al virus.

Grupo 2: peces no tratados, expuestos al virus.

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

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

Grupo 5: grupo tratado con el PACAP a una dosis de 100 μg/L de agua, expuesto al virus.

Grupo 6: grupo tratado con el PACAP a una dosis de 200 μg/L de agua, expuesta al virus.

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

Grupo 8: grupo tratado con la combinación 2 (ribavirina 800 μg/L -PACAP 200 μg/L), expuesto al virus.

Los animales fueron alimentados dos veces al día con una cantidad equivalente al 3% del peso corporal total en cada tanque. Los peces fueron expuestos al virus colocándolos en agua a 10-12 °C conteniendo aproximadamente 10^5 unidades formadoras de placa (pfu)/mL de IPNV (cepa ATCC VR-299) durante 2 horas. Los peces en los Grupos 1 y 2 fueron sometidos al mismo tratamiento de estrés sin el compuesto antiviral o sin la combinación de antiviral y del PACAP. Los peces del Grupo 1 recibieron el mismo procedimiento con medio de cultivo celular en lugar de virus. La identificación del virus se realizó por RT-PCR a partir de riñón y bazo, de acuerdo con el método descrito por López-Lastra et al. (1994) Journal of Fish Diseases 17:269-282. Los tratamientos con PACAP o con la combinación del PACAP y antiviral se realizaron 3 veces a la semana durante 20 días. Los primeros tratamientos se realizaron 2 horas después de la infección viral. Se realizaron observaciones experimentales durante los primeros 20 días de tratamiento y 25 días después de su conclusión. Durante el experimento (45 días) se monitorizaron las muertes y el comportamiento anormal de los peces. Los peces infectados con IPNV que no fueron tratados mostraron signos característicos de necrosis pancreática infecciosa a partir del día 6 después de la infección. La primera muerte ocurrió el día 7 después de la infección, acompañada por el empeoramiento de los signos de la enfermedad en todos los peces y una alta mortalidad los días 11, 12 y 13 después de la infección. En los peces infectados y tratados con ribavirina o el PACAP se detectaron signos de enfermedad el día 8. Los grupos tratados con la combinación de ribavirina y el PACAP y expuestos al virus no presentaron signos de la enfermedad durante el período del experimento.

Los peces no tratados e infectados recuperaron el apetito al día 15 después de la infección. Los peces tratados con el antiviral recuperaron el apetito el día 13, mientras que los peces tratados con el PACAP y las combinaciones del PACAP y ribavirina lo mostraron el día 9 del experimento. Los controles de peces no infectados mostraron un comportamiento normal y no hubo mortalidad en este grupo durante el período del experimento. La mortalidad acumulada en los peces no tratados y los peces infectados con IPNV fue de 40 peces de 50 (20% de supervivencia). En los peces tratados con ribavirina e infectados la supervivencia fue de 68 y 70% para los grupos 3 y 4, respectivamente. En los peces tratados con el PACAP e infectados la supervivencia fue de 50 y 55% para los grupos 5 y 6, respectivamente. En los grupos tratados con las combinaciones del PACAP y ribavirina la supervivencia fue de 97 y 99% en los grupos 7 y 8, respectivamente. En muestras de tejido de peces muertos se encontró la presencia de IPNV. No se detectó virus en muestras tomadas de los grupos no tratados y no infectados.

La Tabla 1 muestra los pesos medios a los 45 días después de la infección. Los peces infectados y no tratados tuvieron un menor aumento de peso en comparación con los peces no infectados. Esta pérdida de peso se compensó en los grupos tratados y más en los grupos tratados con la combinación del PACAP y ribavirina.

Tabla 1. Aumento del peso corporal de la trucha arco iris juvenil durante los 45 días posteriores a la infección.

Grupo Experimental	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Aumento en relación con el 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 una prueba ANOVA seguida por una prueba posterior de Tukey. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas.			

Ejemplo 7. Efecto de la administración del PACAP y la combinación del PACAP más ribavirina formulada en ácido poliláctido ácido coglicólico, a la trucha arco iris (O. mykiss) experimentalmente infectada con IPNV

Se realizó un experimento para evaluar el efecto de la administración del PACAP y la combinación del PACAP y ribavirina contenida en el ácido poliláctico ácido coglicólico (PLGA) a la trucha arco iris experimentalmente infectada con IPNV. Se formaron ocho 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 expuestos 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 pez, expuesto al virus

Grupo 4: grupo inyectado con ribavirina a una dosis de 8 μg/g de pez, expuesto al virus

Grupo 5: grupo PACAP inyectado a una dosis de 0,1 μg/g de pez, expuesto al virus

Grupo 6: grupo PACAP inyectado a una dosis de 0,2 μg/g de pez expuesto al virus

Grupo 7: grupo inyectado con la combinación 1 (ribavirina 4 μg/g PACAP 0,1 μg/g), expuesto al virus

Grupo 8: grupo inyectado con la combinación 2 (ribavirina 8 μg/g PACAP 0,2 μg/g), expuesto al virus

Las nanopartículas que contienen el PACAP o la combinación del PACAP y ribavirina, se administraron por inyección intraperitoneal 2 horas después de la infección viral. Se realizaron observaciones experimentales durante 30 días. Se obtuvieron resultados sobre el índice de supervivencia similares a las descritas en el Ejemplo 6.

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

Se realizó un experimento para evaluar el efecto de la administración del PACAP y la combinación del PACAP y ribavirina para el salmón (Salmo salar) experimentalmente infectado con IPNV. Se formaron ocho grupos experimentales de 50 peces y un tamaño de 1,2 ± 0,3 g cada uno y se mantuvieron en agua a 10-12 °C.

Grupo 1: peces no tratados no expuestos al virus.

Grupo 2: peces no tratados, expuestos al virus.

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

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

Grupo 5: grupo tratado con el PACAP a una dosis de 100 μg/L de agua, expuesto al virus.

Grupo 6: grupo tratado con el PACAP a una dosis de 200 μg/L, expuesto al virus.

Grupo 7: grupo tratado con la combinación de ribavirina 400 μg/L PACAP 100 μg/L, expuesto al virus.

Grupo 8: grupo tratado con la combinación de ribavirina 800 μg/L PACAP 200 μg/L, expuesto al virus.

Los animales fueron alimentados dos veces al día con una cantidad equivalente al 3% del peso corporal total en cada tanque. Los peces fueron expuestos al virus colocándolos en agua a 10-12 °C que contenía aproximadamente 10^5 pfu/mL de IPNV (cepa ATCC VR-299) durante 2 horas. Los tratamientos se realizaron 3 veces por semana durante 20 días. Se realizaron observaciones experimentales durante este período y 25 días después de los últimos tratamientos. Durante los 45 días del experimento, se monitorizaron las muertes y el comportamiento anormal de los peces. Los peces en los Grupos 1 y 2 fueron sometidos al mismo estrés producido por el tratamiento sin el compuesto antiviral o la combinación del PACAP y antiviral. Los peces del Grupo 1 recibieron el mismo procedimiento con medio de cultivo celular en lugar del virus. La identificación del virus se realizó por RT-PCR a partir de riñón y bazo, de acuerdo con el método descrito por López-Lastra et al. (1994) Journal of Fish Diseases 17: 269-282.

Los peces infectados con IPNV y no tratados mostraron signos característicos de necrosis pancreática infecciosa desde el día 6 después de la infección. La primera muerte ocurrió el día 8 después de la infección, acompañada por el empeoramiento de los signos de la enfermedad en todos los peces y una alta mortalidad entre el día 11 y el 15 después de la infección. El porcentaje de supervivencia en este grupo fue del 30%. Hubo una pérdida de 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, y la combinación del PACAP y ribavirina y el grupo no infectado. En los peces infectados y tratados con ambas dosis de ribavirina se detectaron signos tempranos de enfermedad en el día 10 y hubo una supervivencia del 70-76% para las dosis baja y alta, respectivamente. En los peces infectados y tratados con el PACAP la supervivencia fue de un 56-60% para las dosis baja y alta, respectivamente. En el grupo tratado con la combinación de ribavirina y el PACAP y expuesto al virus la supervivencia fue de un 96-98%. En el grupo no infectado y no tratado el porcentaje de supervivencia fue del 98%. En muestras de tejido de peces muertos se encontró la presencia de IPNV.

La Tabla 2 muestra los pesos medios a los 45 días después de la infección. Los peces infectados y no tratados tuvieron un menor aumento de peso en comparación con los peces no infectados. Esta pérdida de peso se compensó en los grupos tratados y más en los grupos tratados con el PACAP y combinaciones del PACAP y ribavirina.

Tabla 2. Aumento del peso corporal de de salmón juvenil del Atlántico durante los 45 días posteriores a la 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 una prueba ANOVA seguida por una prueba posterior de Tukey. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas.			

Ejemplo 9. Efecto de la administración del PACAP y la combinación del PACAP más ribavirina en salmón del Atlántico (Salmo salar) experimentalmente infectado con ISAV

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

Grupo 1: peces no tratados, no expuestos al virus ISA

Grupo 2: peces no tratados, expuestos al virus ISA

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

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

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

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

Grupo 7: grupo tratado con la combinación de ribavirina 400 μg/L PACAP 100 μg/L, expuesto al virus

Grupo 8: grupo tratado con la combinación de ribavirina 800 μg/L PACAP 200 μg/L, expuesto al virus

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

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

Ejemplo 10. Efecto de la administración del PACAP y de la combinación del PACAP y amantadina en la trucha arco iris (O. mykiss) experimentalmente infectada con IHNV

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

Grupo 1: peces no tratados no expuestos al virus

Grupo 2: peces no tratados, expuestos al virus

Grupo 3: grupo tratado con amantadina a una dosis de 400 μg/L de agua, expuesto al virus

Grupo 4: grupo tratado con amantadina a una dosis de 800 μg/L de agua, expuesto al virus

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

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

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

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

Las condiciones experimentales fueron similares a los experimentos descritos en los ejemplos anteriores. Los peces fueron desafiados por inmersión con 5,9 x 10^3 pfu/ml de virus en 20 L de agua con aireación durante 1 hora. Como resultado del experimento se observó una supervivencia de un 26% en los peces no tratados e infectados con IHNV. En los peces tratados con amantadina e infectados con el IHNV, la supervivencia fue del 46%. En los peces tratados con el PACAP e infectados con IHNV, la supervivencia fue del 36%. En los grupos tratados con la combinación del PACAP y amantidina la supervivencia fue de 96-98%.

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

Se realizó un experimento para evaluar el efecto de la administración del PACAP y de la combinación del PACAP y ribavirina en el camarón blanco del Pacífico Litopenaeus vannamei experimentalmente infectado con WSSV. Se formaron cuatro grupos experimentales de 50 camarones de 5 ± 0,5 g cada uno y se mantuvieron en agua de mar a 28 °C:

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

Grupo 1: sin tratamiento, no expuesto al virus WSSV

Grupo 2: sin tratamiento, expuesto al virus WSSV

Grupo 3: tratados con ribavirina, expuestos al virus WSSV

Grupo 4: tratados con el PACAP, expuestos al virus WSSV

Grupo 5: tratados con la combinación de ribavirina y del PACAP, expuestos al virus WSSV. Para el aislamiento y la propagación viral se utilizó el cangrejo Orconectes limosus. El WSSV se purificó a partir de hemolinfa recién extraída mediante centrifugación en gradiente de sacarosa como se describe por Van Hulten et al en 2001 (Van Hulten et al. (2001) Virology 285: 228-33).

Las muestras virales se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Con el fin de minimizar las vías naturales de infección con WSSV y lograr un protocolo reproducible, se utilizó la vía de inmersión para inducir la infección viral experimental. Antes de la infección viral se determinó la concentración viral y la cantidad requerida para causar una mortalidad del 75%. Para ello, los camarones fueron infectados experimentalmente con diferentes diluciones del virus durante un período de incubación de 7 horas.

Después de la infección viral, los camarones se lavaron con agua de mar libre de virus y se colocaron en nuevos recipientes de acuerdo con el diseño de los grupos experimentales descritos anteriormente.

Los tratamientos se administraron 3 veces por semana durante 30 días a una dosis de (500 μg de antiviral/L de agua) o (500 μg de antiviral más el PACAP 200 μg/L de agua), después de la infección. Para el grupo tratado con el PACAP la dosis utilizada fue de 200 μg/L de agua. Los camarones de los Grupos 1 y 2 fueron sometidos al mismo estrés de administración de los tratamientos. Durante los 30 días del experimento se monitorizaron las muertes en cada grupo experimental.

El porcentaje de mortalidad en el Grupo 2 (sin tratamiento, expuesto al virus) fue del 60% en el Grupo 1 (no tratado, no expuesto al virus) fue del 0% en el grupo 3 (tratado con ribavirina, expuesto al virus) la mortalidad fue del 16%, mientras que la mortalidad del grupo tratado con el PACAP fue del 26%. En el grupo tratado con la combinación del PACAP y ribavirina, el porcentaje de mortalidad fue del 2%. En muestras de tejido de camarón muerto se detectó el WSSV por RT-PCR.

Ejemplo 12. Efecto de la administración del PACAP y la combinación del PACAP más ribavirina en ostras de la especie Pecten maximus infectadas experimentalmente con IPNV

Se realizó un experimento para evaluar el efecto de la administración del PACAP y la combinación del PACAP y ribavirina en ostras de la especie Pecten maximus experimentalmente infectadas con IPNV. Se formaron ocho grupos experimentales de 30 ostras adultas cada uno y se mantuvieron en 250 L de agua de mar filtrada a 10 ºC. No

se detectó virus en muestras de hepatopáncreas recogidas antes del inicio del experimento. Los grupos experimentales fueron:

Grupo 1: sin tratamiento, no expuesto al virus

Grupo 2: sin tratamiento, expuesto al virus

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

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

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

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

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

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

Los tratamientos se realizaron 3 veces por semana durante 20 días. Las ostras fueron desafiadas por exposición a 25 L de agua que contenía 10^7 TCID50 mL^{-1} en tanques de 80 L. Después de 6 horas, el agua se reemplazó a un flujo lento de 1 L/minuto y a las 12 horas el flujo se incrementó a 3 L/minuto.

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

Tabla 3. Concentración viral media de IPNV (log_{10}TCID50 g^{-1}) en el hepatopáncreas de las ostras dos semanas después del desafío. Diferentes letras indican diferencias significativas

Grupos	Concentración 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

1. "Polipéptido Activador de la Adenilato Ciclasa de la Pituitaria" (PACAP) para el uso en el tratamiento de infecciones virales y enfermedades infecciosas causadas por virus en organismos acuáticos.

2. PACAP para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el PACAP se obtiene a) por aislamiento a partir de su fuente natural, b) sintéticamente o c) mediante tecnología de ADN recombinante.

3. PACAP para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el PACAP es una secuencia polipeptídica aislada de peces.

4. PACAP para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, en el que el PACAP se utiliza en un organismo acuático seleccionado del grupo que consiste en salmónidos, camarones peneidos y bivalvos.

5. PACAP para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el PACAP se utiliza 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 uso en el tratamiento de enfermedades virales y enfermedades infecciosas causadas por virus en organismos acuáticos que comprende el "Polipéptido Activador de la Adenilato Ciclasa de la Pituitaria" (PACAP).

7. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que se obtiene el PACAP a) por aislamiento de su fuente natural, b) sintéticamente o c) mediante tecnología de ADN recombinante.

8. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizada porque se administra oralmente, por inyección, o por baños de inmersión.

9. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, caracterizada porque el PACAP es una secuencia polipeptídica aislada de peces.

10. Combinación veterinaria que comprende el "Polipéptido Activador de la Adenilato Ciclasa de la Pituitaria" (PACAP) y una molécula antiviral, en la que la molécula antiviral es amantadina, ribavirina o un análogo de ribavirina.

11. La combinación de la reivindicación 10, en la que se obtiene el PACAP a) por aislamiento a partir de su fuente natural, b) sintéticamente, o c) mediante tecnología de ADN recombinante.

12. La combinación de las reivindicaciones 10 o 11 para uso en el tratamiento de enfermedades virales y enfermedades infecciosas causadas por virus en organismos acuáticos.

13. La combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en la que el PACAP y la molécula antiviral se administran por vía oral, por inyección o por baños de inmersión.

14. La combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizada porque

-se aplica como parte de un pienso formulado, en el que el PACAP está a una concentración de 50-750 μg/kg de pienso y el compuesto antiviral está a una concentración de 100 a 2000 mg/kg de pienso

-se aplica por inyección, en donde el PACAP se aplica a una concentración de 0,1-10 μg por gramo de peso corporal (gpc) y la molécula antiviral a una concentración de 1-50 μg/gpc, o

-se aplica por baños de inmersión, en donde el PACAP se aplica a una concentración de 50-1000 μg por litro de agua y la molécula antiviral se aplica a una concentración de 100-2000 μg/L de agua.

15. El PACAP para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el tratamiento comprende la administración del PACAP y la administración simultánea, separada o secuencial de una molécula antiviral durante el mismo tratamiento.

16. Una composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en la que la composición comprende además una molécula antiviral.

Figura 1

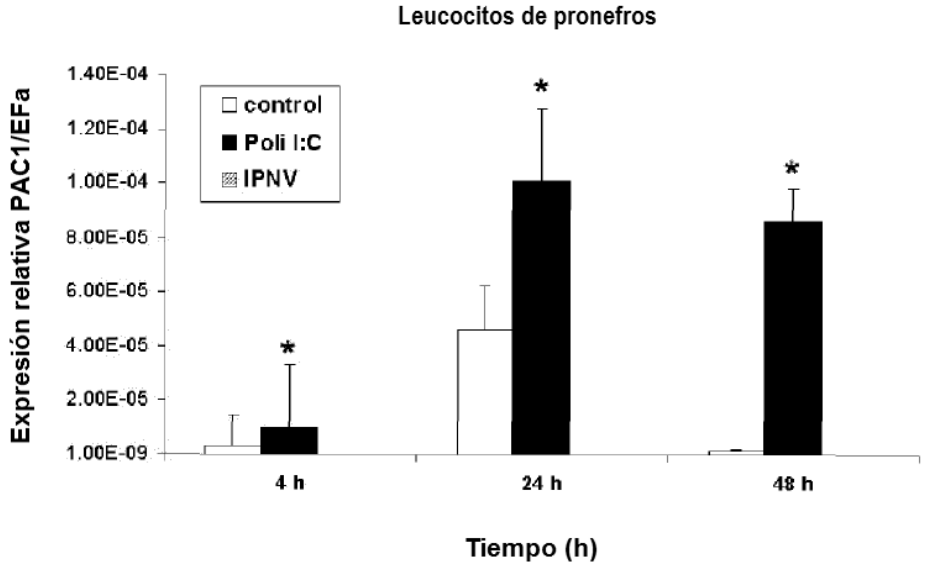


Figura 2

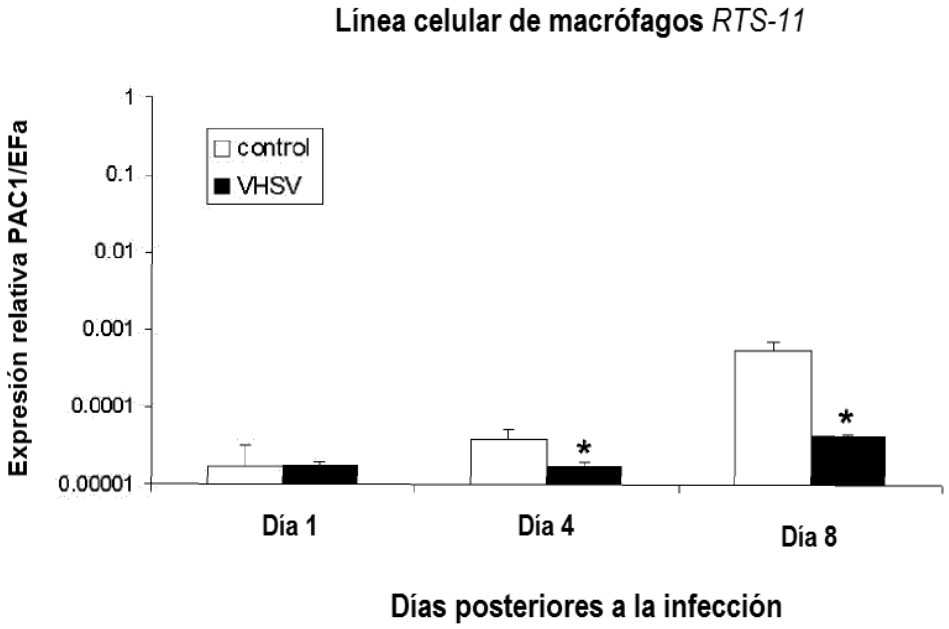


Figura 3

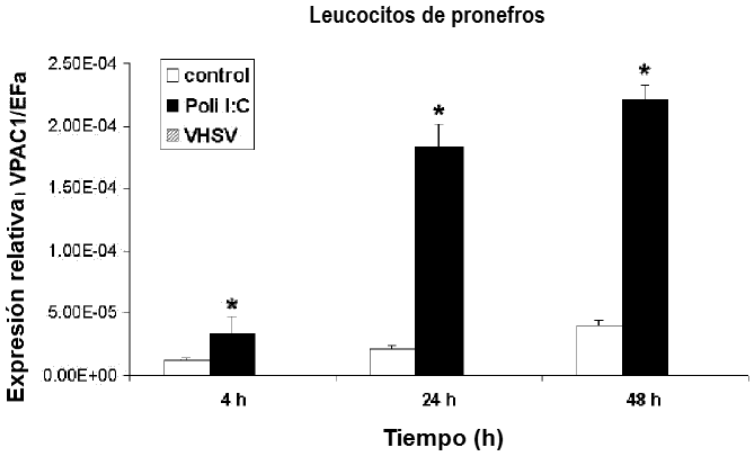


Figura 4

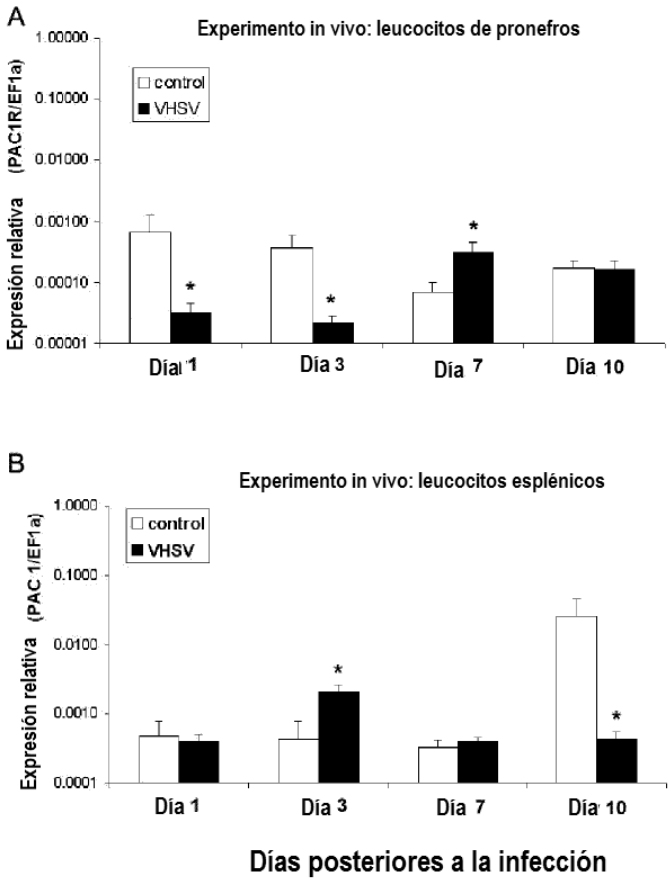


Figura 5

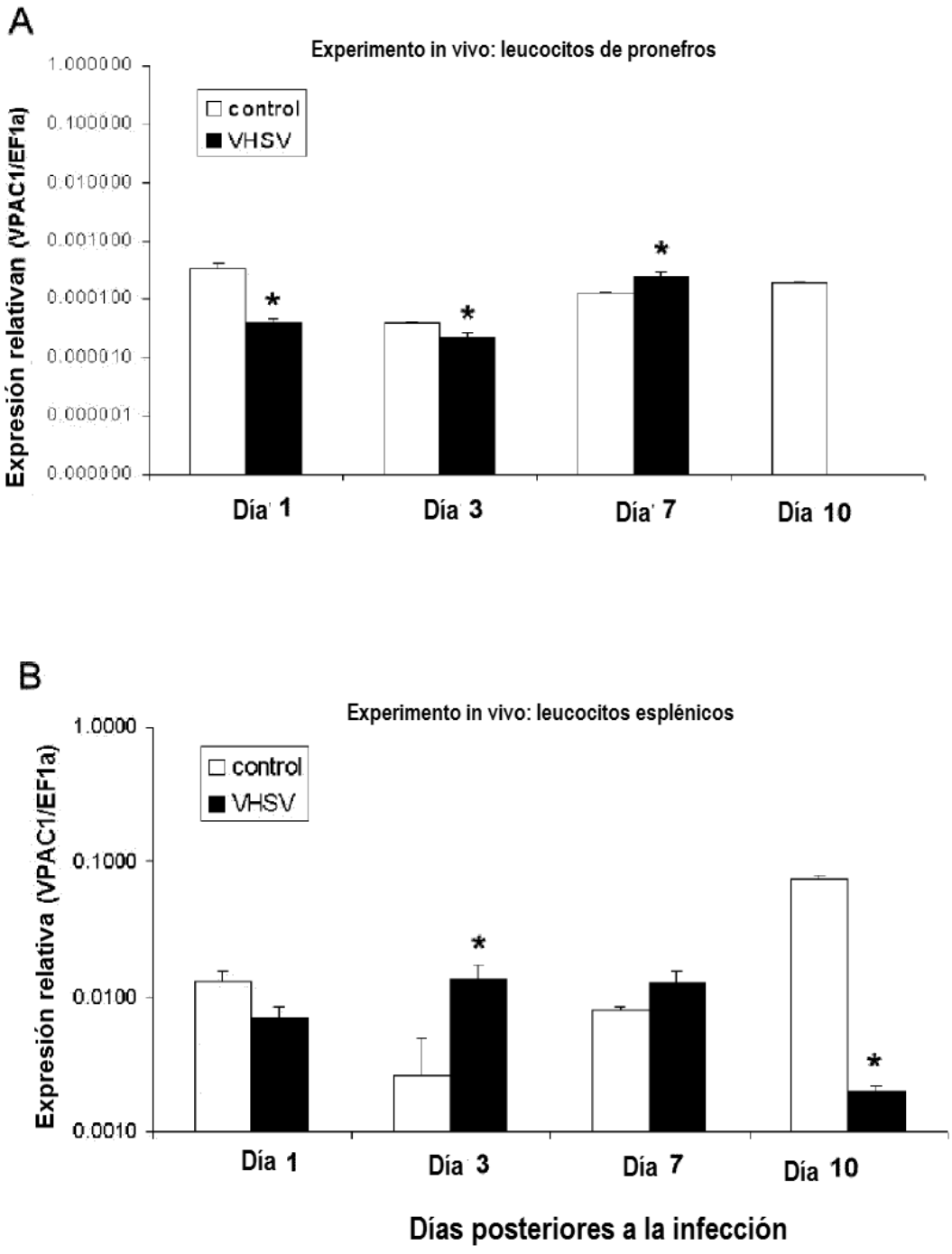

A
Experimento in vivo: leucocitos de pronefros
Expresión relativan (VPAC1/EF1a)
1.000000
0.100000
0.010000
0.001000
0.000100
0.000010
0.000001
0.000000
control
VHSV
*
*
*
Día 1
Día 3
Día 7
Día 10
B
Experimento in vivo: leucocitos esplénicos
Expresión relativa (VPAC1/EF1a)
1.0000
0.1000
0.0100
0.0010
control
VHSV
*
*
Día 1
Día 3
Día 7
Día 10
Días posteriores a la infección

Figura 6

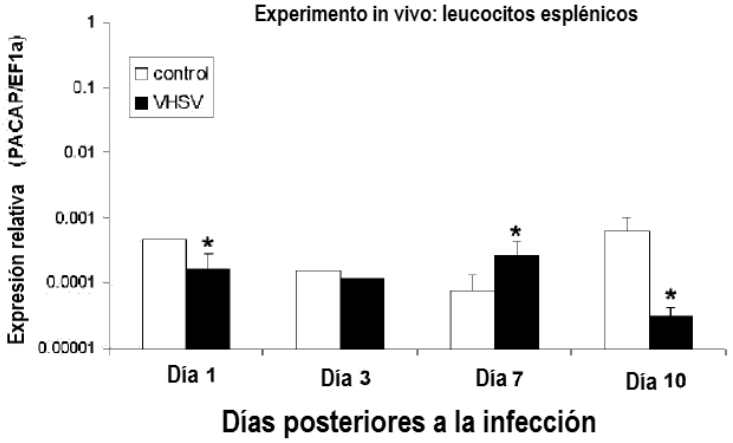


Figura 7

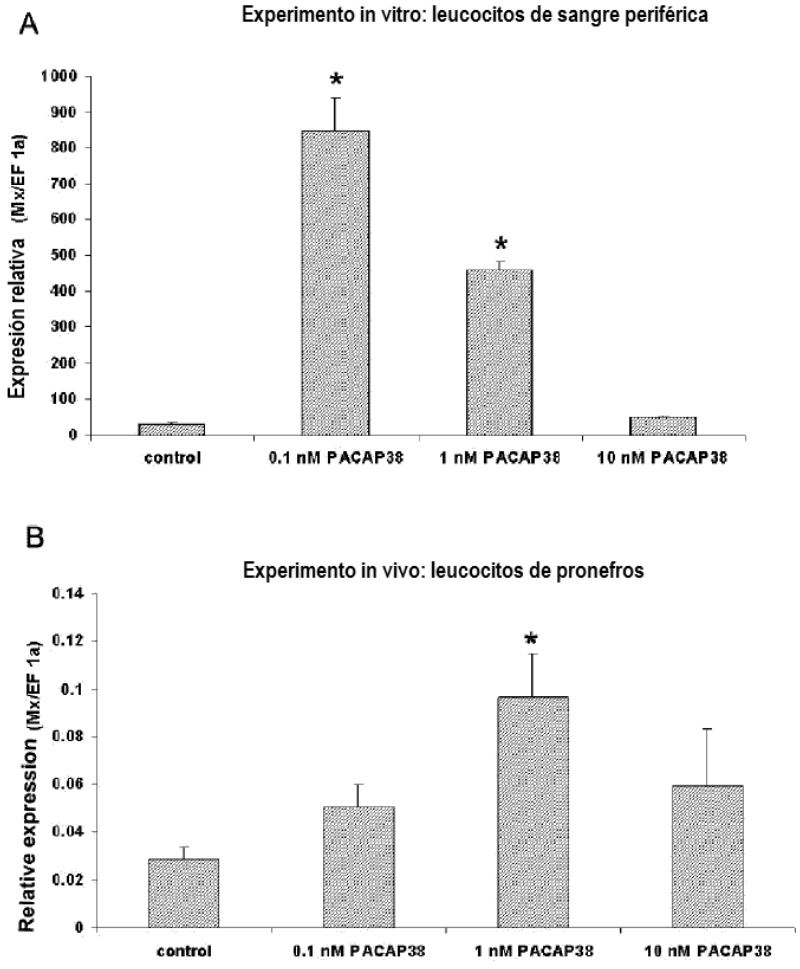


Figura 8

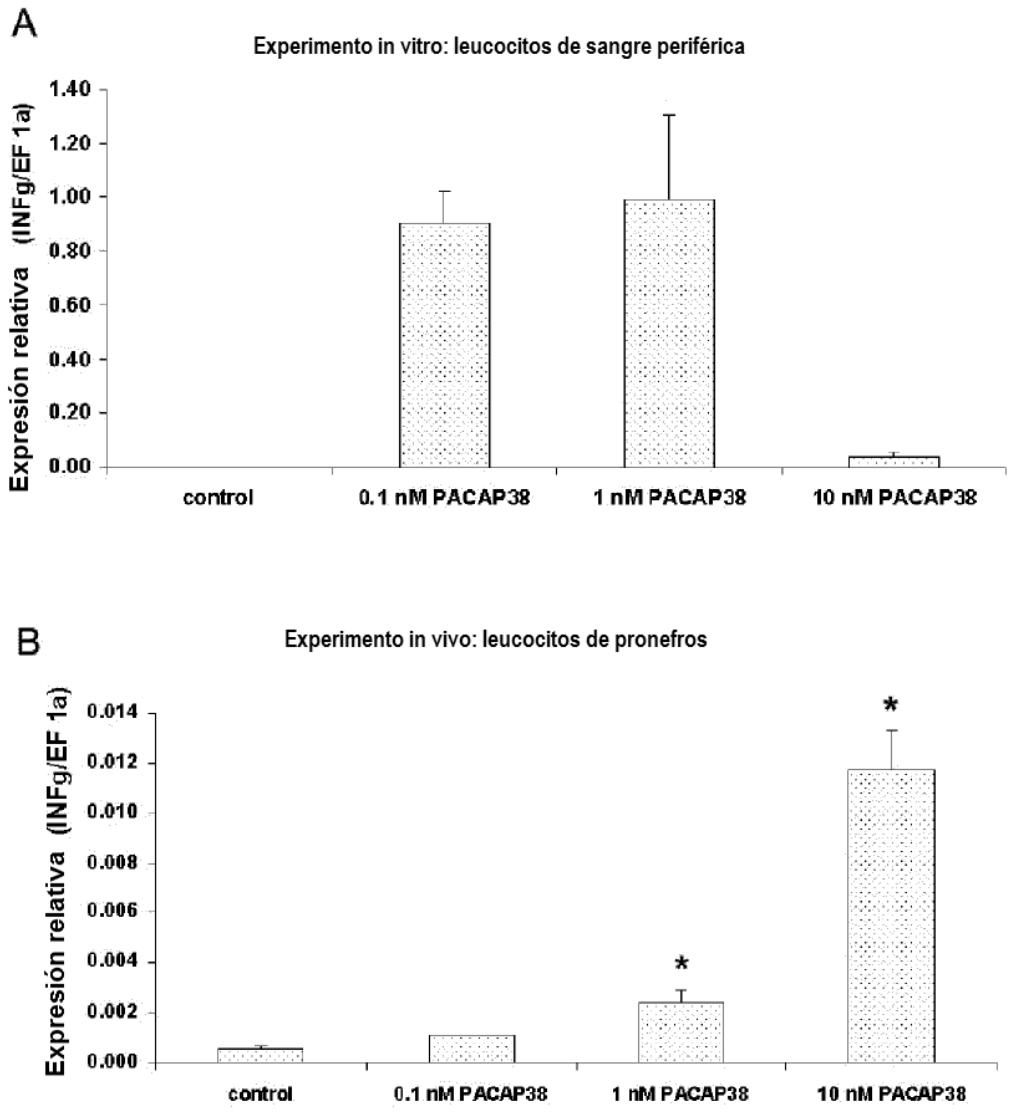

A
Experimento in vitro: leucocitos de sangre periférica
Expresión relativa (INFg/EF 1a)
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
control
0.1 nM PACAP38
1 nM PACAP38
10 nM PACAP38
B
Experimento in vivo: leucocitos de pronefros
Expresión relativa (INFg/EF 1a)
0.014
0.012
0.010
0.008
0.006
0.004
0.002
0.000
*
*
control
0.1 nM PACAP38
1 nM PACAP38
10 nM PACAP38

Figura 9

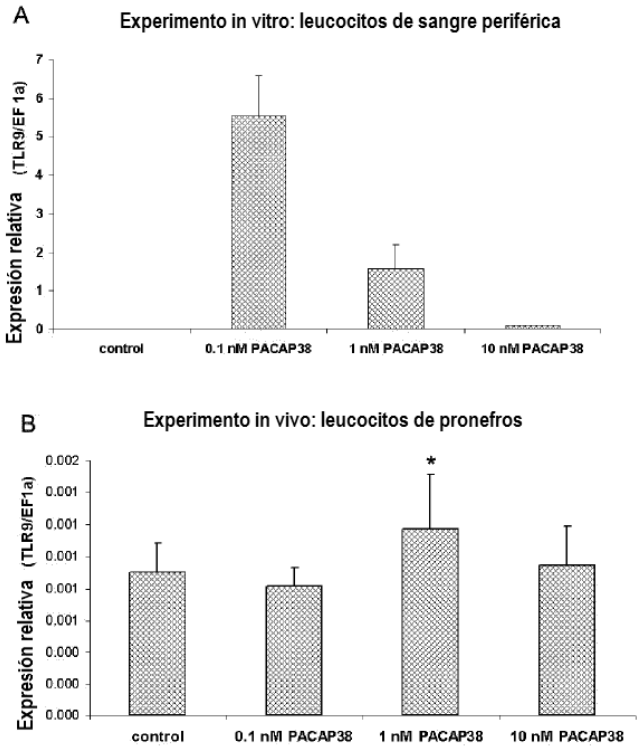


Figura 10

