



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

BIOSELECCIÓN DE PÉPTIDOS Y FRAGMENTOS DE
ANTICUERPOS DESPLEGADOS EN FAGOS QUE SE
UNEN AL VIRUS DEL SÍNDROME DE LA MANCHA
BLANCA

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Biotecnología)

P r e s e n t a

MERCEDES GORETTE SOLIS LUCERO

La Paz, Baja California Sur, Agosto de 2011

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 18 del Mes de Agosto del 2011, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"BIOSELECCIÓN DE PÉPTIDOS Y FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS DESPLEGADOS EN FAGOS QUE SE UNEN AL VIRUS DEL SINDROME DE LA MANCHA BLANCA "

Presentada por el alumno:

Mercedes Gorette Solís Lucero

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

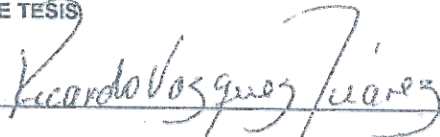
LA COMISION REVISORA



Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
DIRECTOR DE TESIS



Dr. Karen Manoutcharian
CO-TUTOR



Dr. Ricardo Vazquez Juarez
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**Tesis de Maestría en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos
Naturales con Orientación en Biotecnología**

Mercedes Gorette Solís Lucero

Comité tutorial

Director: Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Co-tutor: Dr. Karen Manoutcharian

Co-tutor: Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Comité revisor de tesis

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Dr. Karen Manoutcharian

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Jurado de examen de grado

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova

Suplente: Dr. Claudio Humberto Mejía Ruíz

RESUMEN

El virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) continúa siendo el principal patógeno del camarón cultivado. Debido a las enormes pérdidas económicas que genera es una amenaza para la permanencia y crecimiento de la industria. Hasta ahora no existe ningún tratamiento efectivo contra la infección. En la búsqueda de estrategias potenciales para el control de este patógeno se han utilizado anticuerpos y un péptido que se unen a proteínas virales estructurales claves para la infección con el fin de neutralizarlas. El propósito de este estudio fue bioseleccionar por primera vez fragmentos variables de cadena sencilla de anticuerpos (scFv) humanos, dodecapéptidos lineales y heptapéptidos constreñidos desplegados en fagos que pudieran unirse al WSSV de forma específica utilizando la tecnología de *phagedisplay*. Para ello se tamizaron, mediante tres rondas de bioselección, tres librerías de origen no inmune contra WSSV inactivo inmovilizado. El repertorio de fagos anti-WSSV seleccionados y algunos clones fueron sometidos a prueba de phage ELISA para probar su especificidad observándose clones positivos y un incremento de la señal de la ronda I a la III en todos los casos. Los resultados sugieren que durante las rondas de bioselección se enriquecieron las secuencias más afines por el WSSV y que tanto las poblaciones de fago-scFv y fago-péptidos seleccionados durante la tercera ronda del biopanning, como los clones que despliegan dodecapéptidos L2.6, L3.1; heptapéptidos 7C2.3, 7C2.4, 7C2.7, 7C3.1, 7C3.3, 7C3.4 y scFv S2.5, S3.3, S3.11, S3.12, son potenciales neutralizantes del WSSV dada la especificidad de su unión a proteínas estructurales del virus o una herramienta biotecnológica útil en su detección o investigación.

Palabras clave: Mancha blanca, WSSV, phage display, anticuerpo, péptido

ABSTRACT

White spot syndrome virus (WSSV) remains the mayor cultured shrimp pathogen. Due to the enormous economic losses it generates is a threat to the continuance and growth of the industry. So far there is no effective treatment for the infection. In search of potential strategies to control this pathogen have been used antibodies and a peptide that bind to infection's key structural viral proteins in order to neutralize them. The purpose of this study was to bioselect for first time phage-displayed human single-chain variable fragments of antibodies, linear dodecapeptide and loop-constrained heptapeptide that could bind specifically to WSSV using phage display technology. Three premade nonimmune libraries was screened through three rounds of bioselection against inmovilized WSSV inactive. The repertoire of anti-WSSV selected phage and some clones were tested by phage ELISA to probe their binding specificity observing positive clones and a signal increase of the round I to III in all cases. The results suggest that during bioselection rounds were enriched greater affinity sequences for WSSV and that both populations of phage-scFv and phage-peptides selected during the third round of biopanning, and the phage clones that display dodecapeptides L2.6, L3.1; heptapeptides 7C2.3, 7C2.4, 7C2.7, 7C3.1, 7C3.3, 7C3.4 and scFv S2.5, S3.3, S3.11 S3.12, are potential WSSV neutralizing by their specificity of binding viral structural proteins or a useful biotechnological tool for its detection or scientific research.

Keywords: White spot, WSSV, phage display, antibody, peptide

DEDICATORIA

A los que me alentaron
y dieron fuerzas para no
rendirme en el camino

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer el respaldo y apoyo del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), y las facilidades otorgadas por el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la UNAM, especialmente por la ayuda brindada por los miembros del comité y sus equipos de trabajo pertenecientes a los laboratorios de Patología Marina (CIBNOR) y Biotecnología y Biología Molecular 3 (IIB). Así mismo agradezco las becas otorgadas por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Beca 27784) y al Banco Santander (Beca de Movilidad Nacional).

Al *Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle* por su dirección y la facilitación de los medios para la realización de este trabajo. Por el apoyo y la libertad dada por la confianza que me tuvo al estar siempre dispuesto a escuchar mis opiniones y creer en mí...gracias.

Al *Dr. Karen Manoutcharian* por cobijarme como un miembro más de su grupo. Por la pronta disposición a ayudarme y el compromiso e interés mostrado para la realización de esta tesis. Por su confianza, paciencia, y todas las facilidades brindadas...gracias.

Al *Dr. Ricardo Vázquez Juárez* por tenderme la mano cada vez que me acerque a él por ayuda...gracias.

A la *M en C María Elena Munguía* por el entrenamiento y guía profesional pero sobretodo por su invaluable amistad dentro y fuera de CU. Por los buenos momentos, las risas y las galletas...gracias.

A la *Dra. Goar Gevorkian* y al *M en C Gonzalo Acero* por las facilidades y las atenciones brindadas en la ejecución de este trabajo...gracias.

A la *M en C María de Jesús Romero* por el apoyo brindado, su amistad y por mantener la puerta y la mente abierta con la disposición de ayudar...gracias.

A mi familia: mi madre *María Olga*, mi sobrino *Raúl Alfonso* y mis hermanos *Marisol*, *Fulvia* y *Christopher* (mi hermano hijo de otros padres)... por ser mi núcleo, por sentirse orgullosos de mí y de lo que hago, porque siempre sé que mi fuerza son ustedes y que mis logros son los suyos...muchísimas gracias.

A *Alberto Burgos* por su amistad, cariño y apoyo incondicional, por compartir el trayecto, el desayuno y los días...por su fé en mí, consentirme y compartir mi humor mordaz e inquisitivo...gracias *Kuxu*.

A *Alejandra* y *Rosario* por brindarme su amistad sincera y cariño...por hacerme sentir apoyada en las buenas, las malas y las peores (que a veces parecían ser las más)... por ayudarme a crecer y entender que uno no es una isla...por enseñarme lo que son las verdaderas amigas, por las palabras de aliento, los “aquellarres”, las risas, las charlas y los abrazos...gracias amiguetas.

A *Jesús*, *Laura*, *Leyberth* y *Jairo* por el ánimo que siempre me dan, por estar al pendiente de mis cosas, por la confianza en que lo puedo hacer, su cariño y las buenas vibras...gracias familia JLO.

A mis compañeros de generación *Sergio* y *JuanJo* por brindarme su amistad más allá del CIB, así como a *Rosi*, *Pati*, *Vero*, *Viri*, *Dani* y *Merit* por no rendirse en sus intentos de integrarme al grupo...gracias.

A *Rocío*, *Doña Esperanza*, *Don Genaro*, *Marisol* y *Daniel* por su hospitalidad, por recibirme sin conocerme e integrarme a su cariñosa familia como un miembro más...gracias familia García Paz.

A todos los chicos de los laboratorios *Irasema*, *Gaspar*, *Diana*, *Norma*, *Esther*, *Rodrigo*, *Mario*, *Alejandra*, *Rubén*, *César*, *Claudia*, *Iván*, *Jairo*, *Geraldine*, *Paco*, *Alan*, *Alberto* por facilitarme las cosas con su sonrisa...gracias.

A la gente que ha estado en el camino compartiendo cosas positivas y cuyos nombres haya omitido...gracias.

CONTENIDO

Resumen.....	i
Abstract.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Contenido.....	vi
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	xi
I. Introducción.....	1
1.1 Síndrome de la mancha blanca	1
1.2 Virus del síndrome de la mancha blanca.....	1
1.2.1 Genoma y Proteoma del WSSV.....	3
1.3 Phage Display.....	4
1.3.1 Expresión de péptidos en la superficie de fagos.....	5
1.3.2 Biopanning.....	7
1.3.3 Aplicaciones.....	7
II. Antecedentes.....	9
2.1. Estrategias para el control del WSSV.....	9
2.1.1 Péptidos anti-WSSV.....	10
2.1.2 Anticuerpos y scFv anti-WSSV.....	10
III. Justificación.....	12
IV. Hipótesis.....	14
V. Objetivo.....	14
5.1 Objetivos específicos.....	14
VI. Materiales y métodos.....	15
6.1. Purificación del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca.....	15
6.2 <i>Phage Display</i>	15
6.2.1. Librerías de péptidos.....	16
6.2.1.1 Selección de péptidos específicos contra WSSV por biopanning contra partículas virales.....	17
6.2.1.2 Titulación del fago M13.....	17
6.2.1.3 Amplificación de unidades formadoras de placa (clones).....	18
6.2.2. Librería scFv humano de origen no inmune.....	18
6.2.2.1 Selección de scFv específicos anti-WSSV por biopanning contra partículas virales.....	19
6.2.2.2 Titulación del fagémido.....	19
6.2.2.3 Amplificación y rescate del fagémido.....	20
6.2.3. Purificación de los fagos.....	20
6.2.4 <i>Phage ELISA</i>	21
VII. Resultados.....	25
7.1. Suspensión Viral.....	25
7.2. Preparación del antígeno.....	25
7.3. Selección de dodecapéptidos, heptapéptidos y scFv específicos contra el WSSV por biopanning contra partículas virales.....	26

7.4 Rendimiento de la amplificación de los fagos.....	28
7.5 Comprobación de la especificidad anti-WSSV por prueba de phage ELISA...	30
VIII. Discusión.....	35
IX. Conclusiones.....	41
X. Perspectivas.....	42
XI. Literatura citada.....	43

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Electromicrografía de (a) virión intacto y (b) nucleocápside de WSSV teñido negativamente. Fuente: ICTV.....2
- Figura 2.** Principales proteínas estructurales del WSSV que participan en la infección mediante el acoplamiento, penetración o el tráfico de la nucleocápside al interior del núcleo de la célula hospedera.....3
- Figura 3.** Representación del fago M13. PIII, pVI, pVII, pVIII y pIX simbolizan las proteínas estructurales del fago.....4
- Figura 4.** Representación de (a) fago silvestre, (b) fago recombinante y (c) librería de fagos.....6
- Figura 5.** Librerías de péptidos comerciales NEB donde se indica el segmento aleatorio y el enlazador.....16
- Figura 6.** Genoma del fagémido pCANTAB 5E que muestra las regiones control y la genealogía del vector.....19
- Figura 7.** Diagrama simplificado del biopanning seguido en la búsqueda de péptidos desplegados en fagos capaces de unirse al virus del síndrome de la mancha blanca. En ensayos independientes los billones de péptidos desplegados en cada una de las librerías de fagos fueron tamizados en función de su afinidad por el WSSV al someterse a interacción con el virus, eliminando con lavados aquellos que no se unen para posteriormente recuperar por elusión aquellos que sí lo hacen. Estos últimos se amplificaron infectando una bacteria para obtener múltiples copias que fueron utilizadas en una nueva ronda de selección con la finalidad de enriquecer cada vez más la población de fagos que despliegan las secuencias de péptidos más afines.....22
- Figura 8.** Diagrama simplificado del biopanning seguido en la búsqueda de scFv's desplegados en fagos capaces de unirse al virus del síndrome de la mancha blanca. Los billones de scFv's de origen no inmune desplegados en la librería fueron tamizados en función de su afinidad por el WSSV al someterse a interacción con el virus, eliminando con lavados aquellos que no se unen para posteriormente recuperar por elusión aquellos que sí lo hacen. Estos últimos se usaron para infectar una bacteria replicando el genoma del fagémido. Este fagémido fue recuperado en forma de fago superinfectando la bacteria con fago helper y utilizado en una nueva ronda de selección con la finalidad de enriquecer cada vez más la población de fagos que despliegan las secuencias de scFv más afines.....23
- Figura 9.** Diagrama simplificado de la comprobación de especificidad de las rondas y clones seleccionados durante el biopanning seguido en la búsqueda de péptidos y

scFv's desplegados en fagos capaces de unirse al WSSV. Las rondas de fagos eluidas en el biopanning y posteriormente amplificadas así como algunos clones que se seleccionaron al azar de las cajas de titulación de estas rondas fueron añadidas a título 1 x a pocillos de una microplaca con WSSV inmovilizado. Después de lavar los fagos no unidos se detectaron los fagos que sí se unieron al virus usando un anticuerpo monoclonal anti-M13 producido en ratón y un segundo anticuerpo anti-IgG (H+L) de ratón conjugado a HRP.....24

Figura 10. Homogenización del tejido infectado por WSSV usado para la preparación de la SV. El organismo utilizado fue muerto por Síndrome de la Mancha Blanca tras una inyección de inóculo conteniendo partículas virales de WSSV. La coloración rojiza del cuerpo es un signo clínico propio de la enfermedad causada por la expansión de cromatóforos.....25

Figura 11. Titulación de los fagos y fagémidos. Se realizaron diluciones de los fagos a titular, mismas que fueron utilizadas para infectar bacterias susceptibles. Los títulos se expresan en unidades formadoras de placas en el caso de M13 (A y B) y de unidades formadoras de colonia en el caso del fagémido (C).....26

Figura 12. Fotografía del escalamiento a 500 mL de las rondas I a III seleccionadas a partir de la librería Ph.D-C7C. Las células infectadas con fagos fueron mantenidas a 37°C con agitación de 240 rpm por 4.5 hrs. En la fotografía también aparecen las rondas I a III de Ph.D-scFv infectando 50 mL de bacterias para posteriormente rescatar el fagémido con fago helper y cultivar las células superinfectadas en 500 mL de medio.....29

Figura 13. Phage ELISA de las rondas del biopanning amplificadas y ajustadas a 1011 fagos. Los (A) dodecapéptidos; (B) heptapéptidos contrañidos y (C) scFv-IgG desplegados en fagos fueron expuestos a WSSV inmovilizado en microplacas. Los fagos unidos se detectaron usando un primer anticuerpo monoclonal anti-M13 producido en ratón y un segundo anticuerpo anti-ratón conjugado a HRP. Todas las muestras fueron probadas por duplicado y los valores resultantes promedios se presentan en la figura. El valor de la absorbancia para BSA no se restó en ningún caso.....31

Figura 14. Phage ELISA de los clones aislados al azar de las rondas II y III del biopanning de la librería Ph.D-12. Los clones fueron amplificados y ajustados a un título de UFP para ser expuestos a WSSV inmovilizado en microplacas. Los fagos unidos se detectaron usando un anticuerpo monoclonal anti-M13 conjugado a HRP. Todas las muestras fueron probadas por duplicado y el valor de la absorbancia para BSA no se restó en ningún caso. El valor mostrado para cada clon en la figura está expresado como múltiplos de la lectura obtenida para el control que fue considerada como 132

Figura 15. Phage ELISA de los clones que despliegan heptapéptidos constreñidos aislados al azar de las rondas II y III del biopanning de la librería Ph.D-C7C. Los clones fueron amplificados y ajustados a un título de UFP para ser expuestos a WSSV inmovilizado en microplacas. Los fagos unidos se detectaron usando un anticuerpo monoclonal anti-M13 conjugado a HRP. Todas las muestras fueron probadas por duplicado y el valor de la absorbancia para BSA no se restó en ningún caso. El valor mostrado para cada clon en la figura está expresado como múltiplos de la lectura obtenida para el control que fue considerada como 1.....33

Figura 16. Phage ELISA de los clones que despliegan scFv aislados al azar de las rondas II y III del biopanning de la librería Ph.D-scFv. Los clones fueron amplificados y ajustados a un título de UFC para ser expuestos a WSSV inmovilizado en microplacas. Los fagos unidos se detectaron usando un anticuerpo monoclonal anti-M13 conjugado a HRP. Todas las muestras fueron probadas por duplicado y el valor de la absorbancia para BSA no se restó en ningún caso. El valor mostrado para cada clon en la figura está expresado como múltiplos de la lectura obtenida para el control que fue considerada como 1.....34

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Enriquecimiento de los péptidos y scFv de las diferentes librerías monitoreado durante el biopanning.....	27
Tabla II. Rendimiento típico obtenido en la amplificación de las rondas del biopanning.....	28
Tabla III. Rendimiento típico en el escalamiento a 500 mL de las rondas del biopanning previamente amplificadas.....	29
Tabla IV. Rendimiento típico en la amplificación de Unidades Formadoras de placa y de Colonia tomadas al azar de las placas de titulación de las rondas II y III del biopanning.....	30

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Síndrome de la mancha blanca

El síndrome de la mancha blanca (WSD) constituye hasta el momento el mayor problema de sanidad en las granjas camaronícolas. Esta enfermedad se caracteriza por provocar afectaciones del sistema dérmico, nervioso, hematopoyético, a nivel de mucosas o epitelio manifestadas por la aparición de manchas blancas de 0.5 a 3 mm de diámetro embebidas en el exoesqueleto, coloración rojiza del cuerpo y apéndices por la expansión de cromatóforos, anorexia, letargo, nado errático, acumulación de fluido en las branquias, agrandamiento y coloración amarillenta del hepatopáncreas, adelgazamiento de la hemolinfa, pérdida de cutícula y muerte (@Author, 2004; Escobedo-Bonilla et al., 2008). Estos signos clínicos aparecen 1 o 2 días antes de que ocurra la primera mortalidad que puede alcanzar el 100% en los siguientes 10 días (Lotz y Soto, 2002). Los juveniles de camarón de todas las edades y tallas son susceptibles a la enfermedad, sin embargo, las pérdidas masivas se presentan usualmente 1 o 2 meses post-siembra. El agente etiológico responsable es el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV por sus siglas en inglés). Este virus tiene un amplísimo rango de hospederos y acarreadores mecánicos que incluye crustáceos de importancia en acuicultura tales como camarones, cangrejos y langostas (Escobedo-Bonilla et al., 2008). Su principal vía de infección es el canibalismo de organismos infectados y la inhalación del virus a través de las branquias (@Author, 2004) por lo que luego de su aparición en Taiwán en 1992 se esparció rápidamente a países productores de Asia, América y Europa (Flegel y Fegan, 2002) provocando elevadas pérdidas de producción, merma en los parámetros productivos o disminución en la calidad del producto (Smith et al., 2003) estimados en un billón de dolares anuales (Flegel y Sritunylucksana, 2010).

1.2 Virus del síndrome de la mancha blanca

Debido a sus características generales, moleculares y genéticas, el WSSV es el único miembro del género *Whispovirus*, familia *Nimaviridae*. Morfológicamente este es un gran virus no ocluido, envuelto, de 275 nm de longitud y 120 nm de diámetro, con

forma ovoide a baciliforme que presenta en uno de sus extremos un apéndice tipo cola formado por lípidos de la envoltura (Gracia-Valenzuela et al., 2009). El virión consta de cuatro componentes: envoltura, tegumento, nucleocápside y material genético. Su genoma está compuesto por DNA circular de doble cadena con un tamaño aproximado de 300 kpb (Natividad et al., 2007). El dsDNA puede observarse altamente electrodenso al microscopio ya que se encuentra comprimido por su unión con la proteína viral VP15. El tamaño de la nucleocápside varía entre 180 y 420 nm con un diámetro de 54 a 85 nm y un grosor de pared externa de 6 nm. Está altamente comprimida dentro del virión ya que aumenta de tamaño al liberarse de la envoltura. Se compone de 14 a 15 anillos formados de dímeros y trímeros de la proteína globular VP664 empacados en vertical dándole la apariencia de cilindro entretrejido con una de sus puntas redondeada y la otra cuadrada. La envoltura tiene un grosor de 6 a 7 nm y está compuesta de 2 capas lipídicas electrodensas divididas por una capa electroopaca (Figura 1). El tegumento es la capa localizada entre la nucleocápside y la envoltura. Las proteínas embebidas en la envoltura y el tegumento se encuentran involucradas directamente en el proceso de infección (Chang et al., 2010).

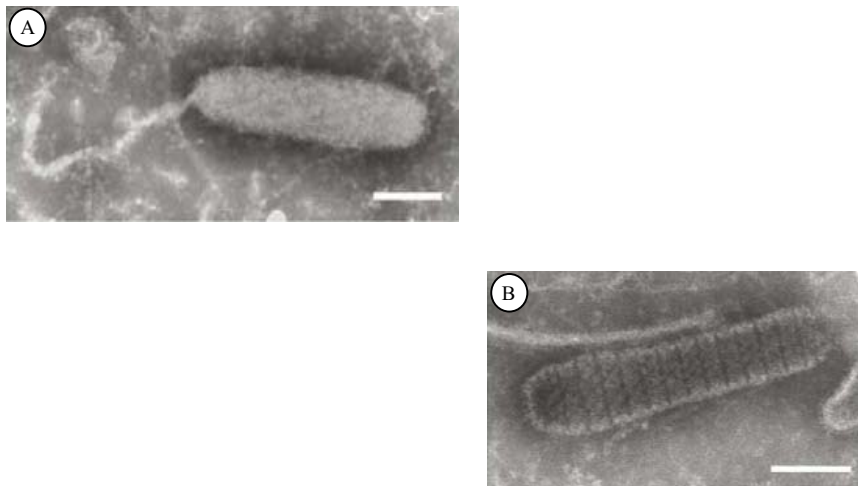


Figura 1. Electromicrografía de (a) virión intacto y (b) nucleocápside de WSSV teñido negativamente. Fuente: ICTV

1.2.1 Genoma y Proteoma del WSSV

El genoma del WSSV es uno de los genomas virales más grandes secuenciados ([://www.giantvirus.](http://www.giantvirus.com)) con un tamaño que varía entre 293 y 307 kbp dependiendo del aislado. Contiene entre 531 y 684 marcos de lectura abiertos (ORFs) con el codón de inicio ATG de los cuales 181 a 184 no codifican para proteínas funcionales. Debido al gran tamaño de su genoma y a que entre el 70 y 80% de las proteínas codificadas no comparten identidad con proteínas conocidas, aún no ha sido caracterizado totalmente (Tsai et al., 2004; Chen et al., 2010). Las proteínas estructurales son importantes para el virus porque resguardan al material genético y sus dominios “se unen a receptores celulares, promueven el proceso de fusión celular o interactúan con elementos del sistema inmune del hospedero”. Se conocen al menos 58 proteínas estructurales del WSSV mediante métodos proteómicos de las cuales al menos 30 se encuentran en la envoltura (Chang et al. 2010). Se les ha asignado nombre de acuerdo a su peso molecular estimado por SDS-PAGE o el número de residuos de aminoácidos (Bustillos-Ruiz et al., 2009). Las proteínas de la envoltura, y en general las proteínas estructurales, son las primeras que interactúan con el hospedero jugando un rol importante en la infección (Chang et al., 2010; Escobedo-Bonilla et al., 2008; Tsai et al., 2004). La proteína VP28 (la más estudiada) y la VP19 se consideran las proteínas más importantes de la envoltura mientras VP24 y VP26 lo son en el tegumento (Flegel y Sritunylucksana, 2010; Yi et al., 2003).

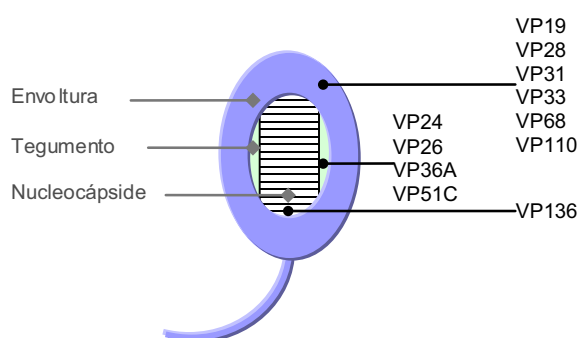


Figura 2. Principales proteínas estructurales del WSSV que participan en la infección mediante el acoplamiento, penetración o el tráfico de la nucleocápside al interior del núcleo de la célula hospedera. Basado en Chang et al. (2010), Li et al. (2005), Tsai et al. (2004), Wu et al. (2005), Xie et al. (2006) y Yi et al. (2004).

Debido a que las proteínas estructurales son las primeras que interactúan con el hospedero se les considera los primeros blancos en estrategias de neutralización o las candidatas más probables para el desarrollo de vacunas (Chang et al., 2010; Tsai et al., 2004).

1.3 Phage display

En 1985, George P. Smith desarrolló una nueva biotecnología basada en la selección específica de variantes de péptidos (incluidos fragmentos de anticuerpos) desplegadas en la superficie de bacteriofagos llamada *phage display* (despliegue en fagos). En esta técnica los péptidos desplegados (usaremos el término péptido para referirnos a una cadena de aminoácidos cualquiera que sea su longitud) en el fago se unen a una molécula blanco cualesquiera tales como antígenos, anticuerpos, enzimas, receptores celulares, etc., en función de su afinidad por ella. Los desplegados más afines se seleccionan mediante un proceso que se lleva a cabo usualmente *in vitro* conocido como *biopanning*. Originalmente esta técnica fue usada para mapear epítomos de anticuerpos (Smith, 1985), sin embargo, actualmente sus aplicaciones son muy diversas sobresaliendo su uso en el descubrimiento y manufactura de fármacos, la ingeniería de anticuerpos y la identificación de ligandos (Yi et al., 2003).

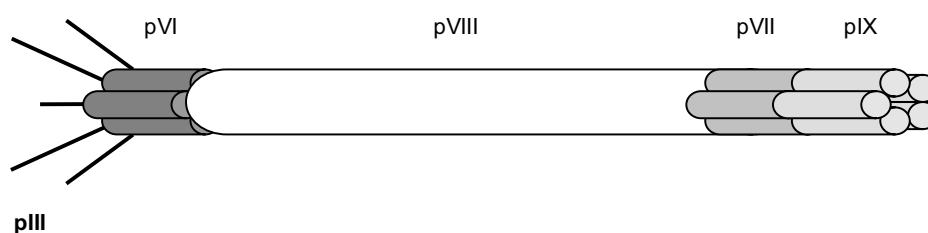


Figura 3. Representación del fago M13. PIII, pVI, pVII, pVIII y pIX simbolizan las proteínas estructurales del fago.

1.3.1 Expresión de péptidos en la superficie de fagos

Los bacteriófagos o simplemente fagos son virus que infectan bacterias. El fago M13 fue el primero en utilizarse en *phage display* y continúa siendo el más usado a pesar de que existen otros vectores alternativos como los fagos fd, fl (Petrenko y Smith, 1997), ft (Arap, 2005), λ y T4 (Sidhu, 2000). El M13 es un fago filamentososo de 895 nm de largo y 9 nm de diámetro estructuralmente formado por cinco tipos de proteína que resguardan al material genético compuesto de DNA de cadena sencilla que contiene 6407 bases que codifican para diez proteínas diferentes (Figura 3). Aproximadamente 2700 copias de la proteína VIII (pVIII) forman la estructura tubular principal mientras que cinco copias de cada una de las proteínas pIII y pVI en un extremo y pVII y pIX en el otro le dan cierre (anónimo).

La forma más sencilla y común de usar al M13 consiste en introducir, mediante biología combinatoria, la secuencia aleatoria de una variante de péptido a la región aminoterminal de pIII o pVIII en el genoma viral para que cuando el fago recombinante infecte a la bacteria exprese este péptido en fusión con la proteína de cubierta y se incorpore así a la nueva generación de fagos desplegándolo en su superficie. La proteína de fusión más usada es pIII. Esta tiene la función de unirse al F-pilus de *E. coli* para comenzar la infección. Si el péptido desplegado es menor a 50 residuos de aminoácido no se presenta atenuación de la infectividad (Cwirla et al., 1990).

El usar pVIII tiene la limitante de que los péptidos mayores a 10 residuos de aminoácido comprometen la función de la proteína de cubierta y podrían no ser desplegados eficientemente (Sidhu, 2000). Para superar esta desventaja, así como para poder desplegar péptidos de más de 50 residuos en pIII, se creó un vector con las ventajas de un *fago* y un *plásmido* llamado fagémido. El fagémido cuenta con dos orígenes de replicación: uno de plásmido y uno de fago por lo que se replica en una bacteria como *E. coli* tal como lo haría un plásmido y se puede recuperar dentro de un fago con la ayuda del fago *helper* que proporciona el código para las proteínas

estructurales y activa el origen de replicación de fago en el fagémido que producirá el péptido fusionado a la proteína viral seleccionada (pIII o pVIII). Debido a esta superinfección y al sistema utilizado, después del ensamblaje la progenie será una variedad de fagos desplegando una mezcla aleatoria del péptido fusionado y la proteína silvestre, además de que contendrá encapsulado ya sea el genoma del fago *helper* o al fagémido. Gracias a que el fagémido y el fago *helper* cuentan con genes de resistencia a diferentes antibióticos, las células infectadas en cada etapa del proceso pueden ser seleccionadas fácilmente (Smith y Petrenko, 1997).

Cualquiera que sea el formato utilizado, el conjunto de fagos que despliegan variantes aleatorias del péptido se denomina librería de fagos (Figura 4). Existen librerías que despliegan péptidos, fragmentos de proteínas inmunológicas y productos de cDNA (Sergeeva et al., 2006). Cuando se trata de péptidos o proteínas relacionadas con el sistema inmune se dice que se trata de librerías de origen inmune o no inmune dependiendo si las secuencias para el *phage display* se obtuvieron o no a partir de la exposición a un antígeno o molécula blanco dada.

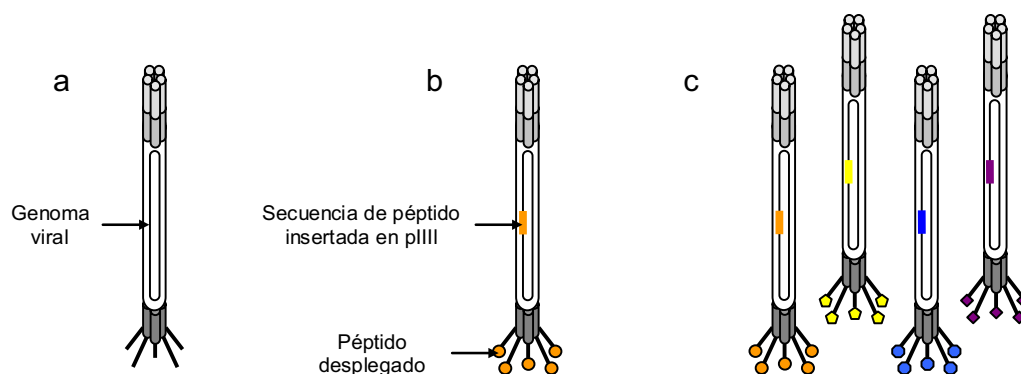


Figura 4. Representación de (a) fago silvestre, (b) fago recombinante y (c) librería de fagos.

1.3.2 Biopanning

Para poder encontrar dentro de la librería de fagos aquellas variantes con afinidad por la molécula de interés o blanco, se realiza un proceso de selección llamado biopanning que se basa en la capacidad de unión péptido-blanco (Yi et al., 2003).

Básicamente implica cinco pasos:

1. Interacción de la librería de fagos con el blanco (inmovilizado, en tejidos o presente en la superficie celular)
2. Remoción de los fagos no unidos (lavado o perfusión)
3. Elusión de los fagos unidos
4. Amplificación de los fagos eluidos mediante infección de una bacteria
5. Uso del amplificado en una nueva ronda de biopanning

Estas rondas de selección/amplificación se repiten 2 o 4 veces con el propósito de “enriquecer” el pool con los péptidos más afines por el blanco. Usualmente al terminar el biopanning algunas clonas individuales o el pool de cada ronda se someten a ELISA para comprobar la especificidad y se secuencian el ADN para encontrar un consenso o conocer la secuencia seleccionada (Arap, 2005).

1.3.3 Aplicaciones

El phage display es una poderosa herramienta ampliamente utilizada en estudios de la estructura-función de proteínas (Wang et al., 2008), mapeo de epítopes, ingeniería de anticuerpos (Chames y Baty, 2000; Noren, 1996), descubrimiento de fármacos (Yi et al., 2003), búsqueda de péptidos que se unen a carbohidratos (Noda et al., 2001), DNA (Cheng et al., 1996) y moléculas pequeñas (Rodi et al., 1999; Wang et al., 2003), identificación de ligandos (Ehrlich y Bailon, 2001), así como la selección de nuevos sustratos de enzimas. La mayoría de estas aplicaciones han sido encaminadas al desarrollo de vacunas (Lesinski y Westerink, 2001; Morales et al., 2008), el

descubrimiento de fármacos (Drews, 2000), la identificación de receptores-ligandos para el combate de enfermedades benignas como la obesidad (Kolonin et al., 2004) y las alergias (Rhyner et al., 2004), y malignas como el cáncer (Pasqualini et al., 2000) mediante terapia dirigida (Arap et al., 2002) y la liberación de genes (Rogers et al., 1998; Sergeeva et al., 2006).

I. ANTECEDENTES

2.1 Estrategias para el control del WSSV

La principal práctica preventiva en las granjas camaronícolas consiste en evitar en lo posible la introducción, contacto, acarreo y propagación del WSSV. Esto ha ayudado a disminuir el riesgo de sufrir la enfermedad. Sin embargo, no es infalible, en algunos casos es difícil de aplicar y una vez que el virus se ha introducido en los estanques NO EXISTE NINGÚN TRATAMIENTO EFECTIVO para controlarlo. Se han probado varias estrategias a nivel experimental. En la mayoría de los casos se logra una reducción de la proliferación viral y un incremento de la sobrevivencia sin que haya hasta el momento ninguna medida realmente efectiva, práctica y específica contra el WSSV (Cheng et al., 2010; Galavíz-Silva et al., 2004; Ligthner, 2005; Natividad et al., 2007; Yuan et al., 2006).

El término vacuna o vacunación es tema de controversia en el caso de crustáceos (Flegel y Sritunylucksana, 2010) ya que estos carecen de un sistema inmune adaptativo y de memoria (Lee y Söderhäll, 2002; Smith et al., 2003) que permita una protección específica y duradera de los organismos. A pesar de ello se ha estimulado el sistema inmune innato de los camarones usando partículas virales inactivadas (Namikoshi et al., 2004; Zhu et al., 2009), proteínas virales aisladas y recombinantes (Caipang et al., 2008; Du et al., 2006; Satoh et al., 2008), sustancias antivirales (Balasubramanian, 2007; 2008; Rameshthangam y Ramasamy, 2007) e inmunoestimulantes de diferentes fuentes (Chang et al., 2003; Pholdaeng y Pongsamart, 2010) con distintos grados de eficacia (Galavíz-Silva et al., 2004). El grado de protección logrado ha hecho que se opte por buscar otras estrategias que no dependan directamente de los efectores del propio sistema inmune del organismo y que sean capaces de inactivar al virus una vez que se presente en los estanques. Tal es el caso del uso de ARN de interferencia (Westenberg et al., 2005; Wu et al., 2007; Xu et al., 2007) y algunos fármacos (Rahman, 2006; Ruan et al., 2010). En el caso de activos de origen proteico se ha experimentado con anticuerpos (Dai et al., 2003; Jiang et al., 2007; Kim et al., 2004; Lu et al., 2008; 2009) y un péptido (Yi et al.,

2003) capaces de neutralizar al virus logrando una reducción de la proliferación viral y un incremento de la sobrevivencia a nivel experimental. La neutralización del WSSV antes mencionada permite suponer su potencial uso como inmunoterapia antiviral (Kim et al., 2004).

2.1.1. Péptidos anti-WSSV

A pesar del uso de péptidos para el control de enfermedades (Juliano et al., 2001), solo existe un trabajo publicado donde se hayan usado péptidos para inhibir al WSSV. Se encontró un decapeptido lineal, seleccionado por *phage display* contra el virión completo, con la secuencia de aminoácidos HLVAVIGSYR que presenta una alta afinidad por el virus y es capaz de neutralizarlo *in vitro* e *in vivo* (Yi et al., 2003).

2.1.2 Anticuerpos y *scFv* anti-WSSV

El uso de anticuerpos contra las proteínas virales VP24, VP28, VP31, VP33, VP36, VP68, VP281 y VP466 permitió relacionarlas al proceso de infección (Li et al., 2006; Wu et al., 2005; Xie y Yang, 2006; Yi et al., 2004). Diversos estudios han logrado la neutralización *in vitro* e *in vivo* del virus usando anticuerpos monoclonales (Jiang et al., 2007; Natividad et al., 2007; Wang et al., 2008b), policlonales (Ha et al., 2008; Musthaq et al., 2006) y *scFv*'s seleccionados mediante *phage display* (Dai et al., 2003; Yuan et al., 2006) dirigidos especialmente contra la VP28 y el WSSV completo. El que los anticuerpos sean capaces de neutralizar y puedan ser usados como inmunoterapias no es un concepto nuevo, recibe el nombre de inmunización pasiva y se viene utilizando desde hace mucho tiempo al administrar a manera de terapia, anticuerpos generados en otro organismo contra una molécula específica (Madigan, 2004). Mención aparte merecen las IgY-anti WSSV provenientes de yemas de huevo y producidas por la administración de WSSV inactivo o proteínas virales (VP28 y VP19) recombinantes o codificadas en vacunas de ADN. Estos anticuerpos han sido probados *in vivo*, purificados y sin purificar, administrados de forma oral (sobre el alimento), por inmersión y por inyección intramuscular en camarones logrando neutralizar al WSSV (Kim et al., 2004; Lu et al., 2008, 2009).

Además del control de la enfermedad, los anticuerpos mono y policlonales producidos contra el WSSV han sido utilizados para el mapeo de epítopes, el estudio del virus y su detección en inmunoensayos (Escobedo-Bonilla et al., 2008; Takahashi et al., 2003). En este último caso, el uso de anticuerpos en pruebas de diagnóstico provee un método rápido, simple y sensitivo para el monitoreo de la presencia del virus en los estanques (Nadala y Loh, 2000). Esto es importante pues la detección oportuna del WSSV minimiza el riesgo de pérdida de la producción (Natividad et al., 2007).

III. JUSTIFICACIÓN

Dos de cada tres camarones que se consumen en el mundo provienen de granjas acuícolas. Los camarones peneidos son las principales especies en cultivo siendo *Litopenaeus vannamei* la más importante en términos de producción. Esta industria ha tenido un espectacular crecimiento en los últimos 30 años y las estadísticas parecen indicar que esta tendencia a la alza continuará (FAO, 2005; Lighthner, 2005). El mayor obstáculo para la sobrevivencia y desarrollo de la industria son las enfermedades de origen vírico ya que provocan altas mortalidades. El virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) es el principal patógeno de los camarones en cultivo (Flegel et al., 2008). Se han reportado infecciones por WSSV en diversos peneidos de importancia en acuicultura como *Litopenaeus vannamei*, *Penaeus monodon*, *Litopenaeus stylirostris*, *Marsupenaeus japonicus*, *Ferfenpenaeus chinensis* y crustáceos como *Macrobranchium rosenbergii* y *Procambarus clarkii* (Escobedo-Bonilla et al., 2008; Rameshthangam y Ramasamy, 2007). La peligrosidad del WSSV radica en el hecho de que es capaz de provocar mortalidades acumuladas de hasta el 100% en tan solo 3 a 10 días después de que se presentan los primeros signos clínicos (Escobedo-Bonilla et al., 2008). Desde su aparición en granjas taiwanesas en 1992 y luego de su rápida diseminación alrededor del mundo, este virus ha sido el responsable de pérdidas de producción, dinero y empleos, así como de la implementación de restricciones para la exportación de productos (Bondad-Reantaso et al., 2005). México es el principal productor camaronícola de América (sexto a nivel mundial) y no ha estado exento de los estragos causados por este virus desde que se reportó por primera vez en el 2001 (Bondad-Reantaso et al., 2001; FAO, 2005). Dado el impacto socioeconómico que representa la potencial pérdida de la producción, se han realizado números estudios enfocados en minimizar el riesgo de sufrir el colapso de la industria. A pesar de las medidas tomadas no existe ninguna manera de garantizar la protección de los organismos (Flegel y Sritunylucksana, 2010; Natividad et al., 2007; Yuan et al., 2006), por lo que el desarrollo de tratamientos efectivos que permitan prevenir o controlar la infección del WSSV sigue siendo un área prioritaria de investigación (FAO, 2005). La vacunación de los

organismos sería la primera opción para controlar la infección viral, sin embargo, el uso de vacunas tradicionales (partículas virales atenuadas o inactivas) así como el uso de antígenos virales han resultado ineficaces (Galavíz-Silva et al., 2004) debido a la carencia de un sistema inmune específico y de memoria en los crustáceos (Lee y Söderhäll, 2002; Smith et al., 2003). Otras estrategias implementadas presentan desventajas tales como la contaminación del agua por el uso de fármacos (Rahman, 2006) o químicos (Jiang et al., 2004) en los estanques y sus implicaciones ecológicas, la inespecificidad del tratamiento (Pholdaeng y Pongsamart, 2007) y la baja protección lograda (Wu et al., 2007). La búsqueda de otras alternativas basadas en el propio sistema inmune del crustáceo se ve obstaculizada por el escaso conocimiento de la respuesta antiviral del hospedero y la poca información de los mecanismos y componentes moleculares del WSSV involucrados en la infección (Flegel y Sritunylucksana, 2010; Liu et al., 2009). Diversos estudios han logrado la neutralización o inactivación exitosa del virus mediante la utilización de péptidos y anticuerpos tanto policlonales como monoclonales anti-WSSV generados en organismos superiores, así como fragmentos variables de cadena sencilla de anticuerpos producidos mediante biología combinatoria (Jiang et al., 2004; Kim et al., 2004; Li et al., 2006; Lu et al., 2008; 2009; Yi et al., 2003; 2004). El que estos puedan proteger a organismos marinos por vía oral o por inmersión permite que su uso pueda ser práctico a nivel comercial (Lu et al., 2008; 2009). El inconveniente que representa la búsqueda y producción de péptidos y anticuerpos específicos radica en la necesidad de mucho tiempo, organismos y un proceso de purificación posterior. El *phage display* supera estas adversidades ya que permite la selección *in vivo* de péptidos y proteínas específicas contra un blanco determinado de manera fácil y rápida (comparada con los procedimientos convencionales) y la producción de grandes cantidades de estos reactivos en corto tiempo sin pérdida de especificidad (Arap, 2005). Esta técnica puede ser utilizada en la búsqueda de nuevos péptidos y fragmentos de anticuerpos potencialmente capaces de neutralizar al WSSV o que puedan ser usados en estudios de investigación de este virus.

IV. HIPÓTESIS

Si se han reportado anticuerpos y un péptido que por su afinidad y especificidad por proteínas estructurales del WSSV han servido para mapear, identificar, monitorear e incluso neutralizar al virus y el *phage display* permite seleccionar fragmentos de anticuerpos y péptidos basándose en su afinidad por una molécula blanco, entonces esta técnica permitirá encontrar una variedad de péptidos con diferentes conformaciones y *scFv*'s desplegados en fagos capaces de unirse de forma específica al WSSV que podrían ser usados como nuevas herramientas biotecnológicas contra el virus.

V. OBJETIVO

Bioseleccionar péptidos y *scFv* de anticuerpos desplegados en la superficie de fagos filamentosos que se unan de forma específica al WSSV.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Bioseleccionar aquellos dodecapéptidos lineales, heptapéptidos consteñidos y *scFv*-IgG humanos de origen no inmune desplegados en fagos que muestren una mayor afinidad por el WSSV.
- Comprobar mediante prueba de *phage* ELISA que las poblaciones de fagos recuperadas en la bioselección (rondas) y algunos de los clones seleccionados al azar que las conforman se unan al WSSV de forma específica.

VI. MATERIALES Y METODOS

6.1 Purificación del virus del síndrome de la mancha blanca

El WSSV usado para la etapa de bioselección de esta investigación fue reproducido en camarones *Litopenaeus vannamei* en el Centro Interdisciplinario de Investigaciones para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa, México). El tejido infectado fue proporcionado al Dr. Felipe Ascencio (CIBNOR) para su posterior purificación siguiendo el protocolo descrito por Gracia et al. (2009). El tejido de camarón infectado con WSSV fue homogenizado en relación 1:4 con solución salina 150 mM estéril en un mortero y centrifugado a 3000xg por 20 min a 4°C. El sobrenadante se centrifugó a 8000xg por 30 min a 4 °C y posteriormente se pasó a través de un filtro 0.45 y luego de 0.22 µm (Acrodisc® Srynger Filter, PALL Life Sciences, USA). El filtrado se colocó en un filtro Amicon de 100 kDa de exclusión (Amicon Ultra-15 100 kDa Ultracel-PL, Millipore®) y se centrifugó a 1000xg por 1 hr a 4°C. El material retenido (viriones de WSSV) se recuperó y diluyó en 1 mL de solución salina 150 mM estéril. La cantidad de proteínas totales de la suspensión viral (SV) fue determinada mediante la técnica de Bradford para posteriormente ser sometida a prueba de PCR antes de usarse en el biopanning y las pruebas de *phage* ELISA.

6.2 *Phage display*

Se utilizaron dos librerías de péptidos comerciales prefabricadas, una lineal y otra constreñida, además de una librería de *scFv*-IgG humanos de origen no inmune (*scFv*-IgG naïve). Todas las librerías así como las cepas ER2738 y TG1 de *Escherichia coli* necesarias para su propagación fueron proporcionadas por el Dr. Karen Manoutcharian del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIE) de la UNAM. La selección de péptidos y *scFv*'s se llevó a cabo en el laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología 3 de la Nueva Sede del IIE bajo la supervisión del Dr. Karen Manoutcharian y la M. en C. María Elena Munguía, mientras que los ELISA's se realizaron en el laboratorio de Inmunología 103 de la vieja sede que está bajo la responsabilidad de la Dra. Goar Gevorkian contando con la ayuda del M. en C.

6.2.1.1 Selección de péptidos específicos contra WSSV por biopanning contra partículas virales

Las librerías Ph.D-12 y Ph.D-C7C fueron probadas en ensayos independientes siguiendo el protocolo que a continuación se describe (Figura 7). En una microplaca de 96 pozos (Maxisorb; Nunc) se inmovilizó directamente WSSV inactivo (400 ng de proteína total) en PBS pH 7.2 durante toda la noche a 4°C. Después, el WSSV libre se retiró lavando con la solución de lavado PBS/0.2% Tween 20 para posteriormente bloquear con PBS que contenía 5% de leche descremada en polvo por 1 hr a 37°C. La solución de bloqueo se retiró y se agregó la librería (1 x u.f.p) previamente incubada por 30 minutos en PBS/0.5% Leche descremada/0.2% Tritón dejando interactuar por toda la noche a 4°C. Los pozos fueron lavados y los fagos que se unieron al WSSV fueron eluidos con Trietilamina 100 mM. Inmediatamente después el eluato fue neutralizado con Tris-HCl 1M. Se tomó una alícuota para titularse contando el número de unidades formadoras de placa usando *E. coli* ER2738 como se describe posteriormente y 150 µl se almacenaron a 4°C. El resto del eluido fue amplificado por 4.5 hrs infectando un dilución 1:100 de ER2738 que creció durante toda la noche anterior. Este amplificado fue purificado y titulado para su utilización en la siguiente ronda de selección. Se realizaron en total 3 rondas de biopanning eliminando los fagos no unidos incrementando los lavados de 5 a 10 y luego a 15 en la última ronda. Cada una de las rondas así como algunas clonas seleccionadas al azar fueron sometidas a prueba de *phage* ELISA para comprobar su especificidad por el WSSV como se describe más adelante.

6.2.1.2 Titulación del fago M13

Se realizaron diluciones seriales en medio 2YT de los fagos eluidos y amplificados. Cada una de las diluciones se usó para infectar 200 µl de células ER2738 en crecimiento logarítmico (~ 0.5) por 15 minutos a 37°C. Las células infectadas fueron transferidas a tubos cónicos que contenían Top Agar a 45°C, mezcladas rápidamente y vertidas sobre cajas de LB previamente calentadas a 37°C. Después que las placas se enfriaron fueron incubadas toda la noche a 37°C. Para obtener el título (número de

unidades formadoras de placa) se contó el número de placas en cada caja de LB, se multiplicó cada número por el factor de dilución y por el número de μl usados para la infección.

6.2.1.3 Amplificación de unidades formadoras de placa (clones)

Se cultivo una colonia de ER2738 en medio 2YT por toda la noche a 37°C con agitación. Temprano se realizó una dilución 1:100 en medio 2YT. Se transfirieron 3 ml de esta dilución a tubos estériles para ser infectados con placas individuales provenientes de la titulación de los eluidos de las rondas II y III tomadas al azar. Los tubos fueron incubados a 37°C con agitación por 4.5 hrs. Pasado este tiempo los fagos amplificados fueron purificados, titulados (ver sección correspondiente) y usados en pruebas de ELISA. De igual forma se llevó a cabo un escalamiento a 500 mL de cultivo celular para la amplificación de las rondas del biopanning.

6.2.2 Librería *scFv* humano de origen no inmune

Los *scFv* se forman por un solo gen que codifica los dominios de unión a antígeno de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH) de la IgG conectadas por un péptido enlazador flexible. La librería de *scFv*-IgG naïve usa al fagémido pCANTAB 5E para su producción. Este fagémido carece de los genes para producir un fago completo. Además de los genes que codifican para fragmentos variables de anticuerpos (VH + VL) y el péptido enlazador que forman el *scFv*, posee un promotor *lac* para el control de la expresión de pIII-*scFv*, una secuencia señal para el gen 3, el gen de la proteína pIII, una región y un origen de replicación de M13, una región del gen de β -lactamasa, un origen de replicación del plásmido, un codón ámbar de paro y la secuencia GGT GCG CCG GTG CCG TAT CCG GAT CCG CTG GAA CCG CGT correspondiente a la E-tag. El pCANTAB 5E puede multiplicarse como plásmido o alternativamente empacarse como fago recombinante mediante el uso de un fago helper como el M13K07. El fagémido presenta factores de resistencia a penicilina mientras que M13K07 posee un origen de replicación deficiente y resistencia a

kanamicina que facilita la selección de las células TG1 transformadas por el fagémido e infectadas por el fago helper (Amersham Recombinant Phage Antibody System).

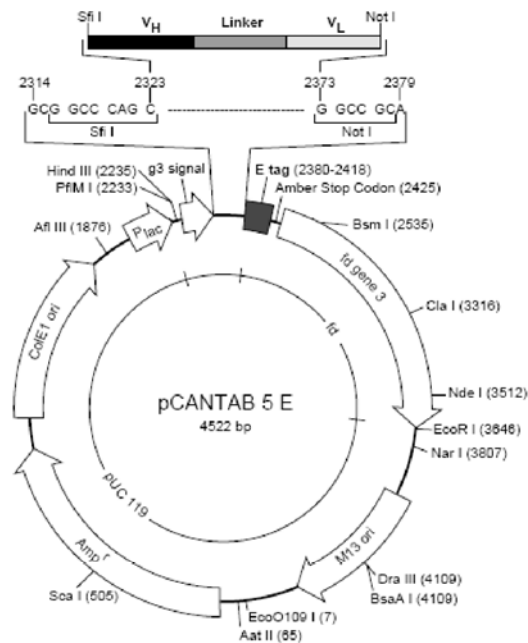


Figura 6. Genoma del fagémido pCANTAB 5E que muestra las regiones control y la genealogía del vector.

6.2.2.1 Selección de *scFv* específicos anti-WSSV por biopanning contra partículas virales

Se siguió el procedimiento descrito para la selección de péptidos específicos solo variando la forma de titular y amplificar al fagémido (Figura 8) como se describe en el siguiente punto.

6.2.2.2 Titulación del fagémido

Se realizaron diluciones seriales en medio 2YT de los fagos eluidos y amplificados. Cada una de las diluciones se usó para infectar 200 μ l de células TG1 en crecimiento logarítmico (~ 0.5) por 45 minutos a 37°C. Pasado ese tiempo, las células infectadas

fueron plaqueadas en LB que contenía ampicilina y glucosa al 2%. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C. Para obtener el título (número de unidades formadoras de colonia) se contó el número de colonias en cada caja de LB/Ampicilina/Glucosa, se multiplicó cada número por el factor de dilución y por el número de μl usados para la infección.

6.2.2.3 Amplificación y rescate del fagémido

Una asada de TG1 se sembró en medio 2YT/Glucosa al 2% y se cultivó a 37°C con agitación hasta alcanzar la fase de crecimiento logarítmico. Estas células fueron infectadas con fagémidos provenientes de las rondas de biopanning, o de colonias aisladas tomadas al azar de las placas de titulación, e incubadas a 37°C por 30 minutos sin agitación seguidos de 30 minutos con agitación. Las células infectadas se seleccionaron añadiendo ampicilina al cultivo y permitiendo su multiplicación por 2 hrs. Posteriormente se tomaron dos alícuotas para almacenarse a -80°C (crioprotegidas con glicerol estéril). Para rescatar el fagémido en forma de fago recombinante se añadieron 10 MOI del fago helper M13KO7 permitiendo que la infección ocurriera a 37°C por 30 minutos sin agitación seguidos de 30 minutos con agitación. Luego las células super infectadas con pCANTAB 5E y M13KO7 fueron seleccionadas al escalarse en un matraz con 40 ml de 2YT conteniendo ampicilina y kanamicina y dejándolas proliferar por 18 hrs a 30°C. Pasado este tiempo los fagos amplificados fueron purificados y titulados (ver sección correspondiente) para posteriores usos. De igual forma se llevó a cabo un escalamiento a 500 mL de cultivo celular para la amplificación de las rondas del biopanning.

6.2.3 Purificación de los fagos

Según fue el caso, las células infectadas de ER2738 usadas en la amplificación de M13 o de TG1 usadas en la amplificación de fagémido, fueron centrifugadas a 8,000 rpm por 20 min a 4°C. El sobrenadante se separó y se mezcló con 1/6 de volumen de PEG al 20%/ NaCl 2.5 M precipitando el fago por un mínimo de 2 hrs sobre hielo. Pasado ese tiempo la mezcla se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a 4°C. Se

descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 1.5 ml de TBS para volverse a precipitar con 1/6 de PEG/NaCl por 1 hr sobre hielo. Por último, se centrifugó a 15,000 rpm por 15 min a 4°C y el pellet se resuspendió en el mínimo volumen de TBS. Los fagos y fagémidos así purificados fueron almacenados a 4°C para posteriores usos y titulados siguiendo los protocolos anteriormente descritos.

6.2.4 *Phage* ELISA

Se sensibilizó una microplaca por toda la noche a 4°C con 1 µg de proteínas totales de WSSV en PBS pH 7.4 por cada pozo. El WSSV que no quedó inmovilizado a la placa se removió con la solución de lavado PBS/Tween 20 al 0.2%. Los pozos fueron bloqueados a 37°C por 1 hr con PBS/Leche al 5%. Posteriormente las rondas I, II y III del biopanning o fagos amplificados, fueron depositadas en pozos separados e incubados por al menos 2 hrs. Todos los fagos aquí utilizados fueron previamente ajustados a un título de 1 x e incubados en PBS/Leche 0.5%/Tritón 0.2% por 30 min a 37°C. Los fagos no unidos al WSSV fueron eliminados mediante cuatro lavados. Para revelar la presencia de fagos unidos al WSSV se adicionó un primer anticuerpo monoclonal anti-M13 producido en ratón (Amersham) diluido 1:2000 en PBS/Leche 0.5%/Tritón 0.2%, seguido de un segundo anticuerpo anti-IgG (H+L) de ratón producido en cabra y conjugado a HRP (ZyMax) diluido 1:2500. Cada uno de los anticuerpos utilizados fueron incubados en la placa por 1 hr a 37°C (el 2do. en oscuridad) y el exceso eliminado con cuatro lavados. Por último se agregó o-fenilendiamina (OPD) como sustrato cromogénico de la enzima (Figura 9). Se incubó a 37°C leyendo en lector para microplacas a 450 nm comparando la señal obtenida contra el blanco. En este ensayo se usó como control negativo 1 mg ml⁻¹ de BSA. Se considera como positiva aquella señal que sea por lo menos dos veces la lectura del blanco.

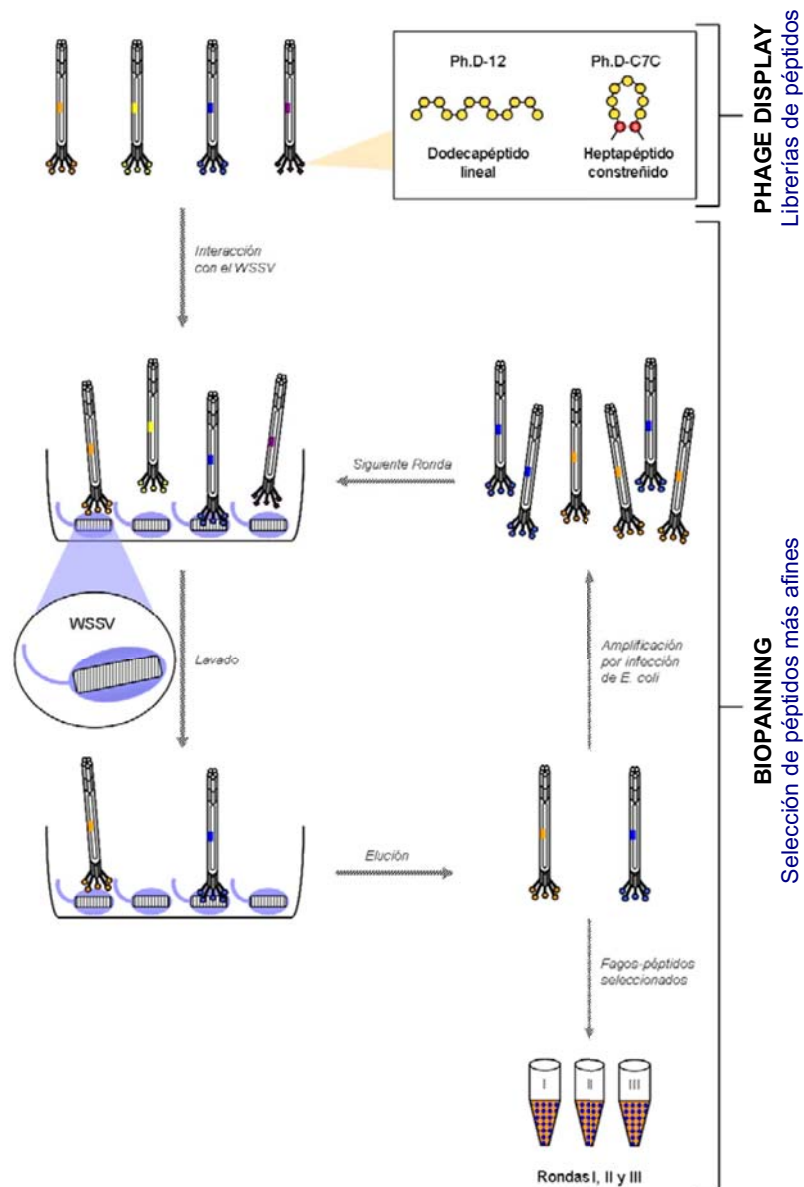


Figura 7. Diagrama simplificado del biopanning seguido en la búsqueda de péptidos desplegados en fagos capaces de unirse al virus del síndrome de la mancha blanca. En ensayos independientes los billones de péptidos desplegados en cada una de las librerías de fagos fueron tamizados en función de su afinidad por el WSSV al someterse a interacción con el virus, eliminando con lavados aquellos que no se unen para posteriormente recuperar por elusión aquellos que sí lo hacen. Estos últimos se amplificaron infectando una bacteria para obtener múltiples copias que fueron utilizadas en una nueva ronda de selección con la finalidad de enriquecer cada vez más la población de fagos que despliegan las secuencias de péptidos más afines.

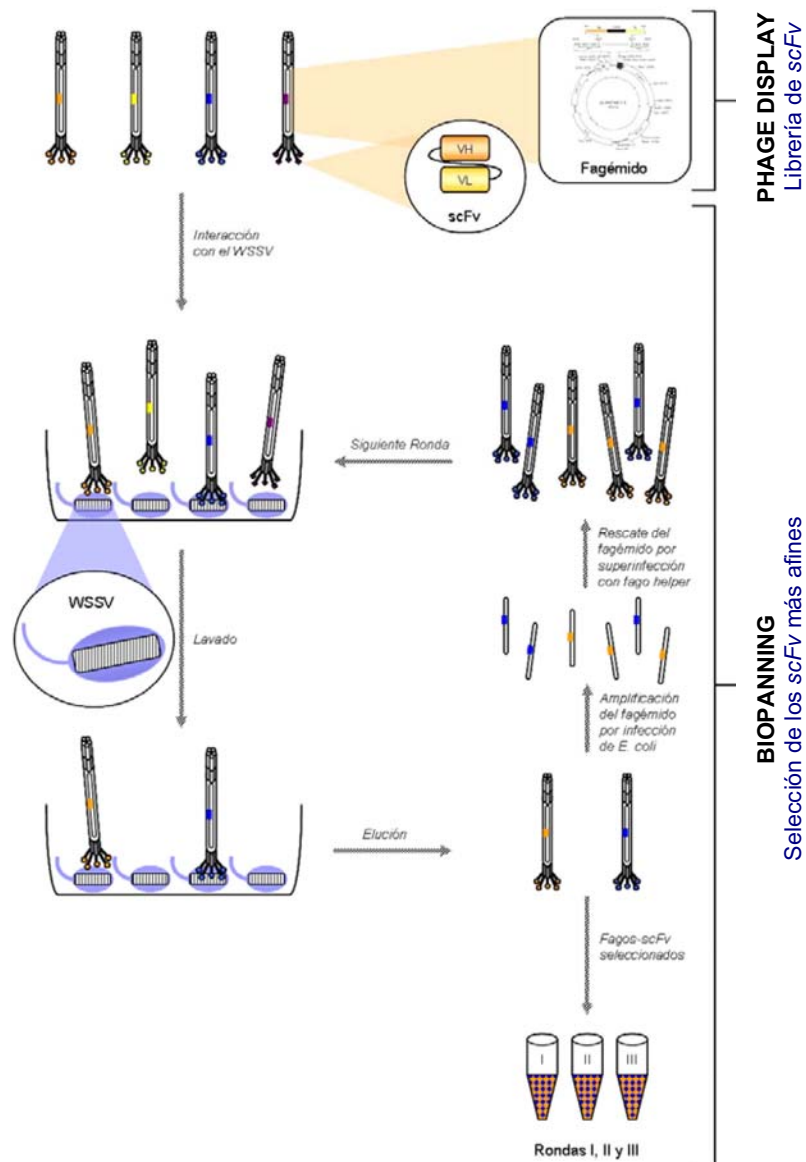


Figura 8. Diagrama simplificado del biopanning seguido en la búsqueda de *scFv*'s desplegados en fagos capaces de unirse al virus del síndrome de la mancha blanca. Los billones de *scFv*'s de origen no inmune desplegados en la librería fueron tamizados en función de su afinidad por el WSSV al someterse a interacción con el virus, eliminando con lavados aquellos que no se unen para posteriormente recuperar por elución aquellos que sí lo hacen. Estos últimos se usaron para infectar una bacteria replicando el genoma del fagémido. Este fagémido fue recuperado en forma de fago superinfectando la bacteria con fago helper y utilizado en una nueva ronda de selección con la finalidad de enriquecer cada vez más la población de fagos que despliegan las secuencias de *scFv* más afines.

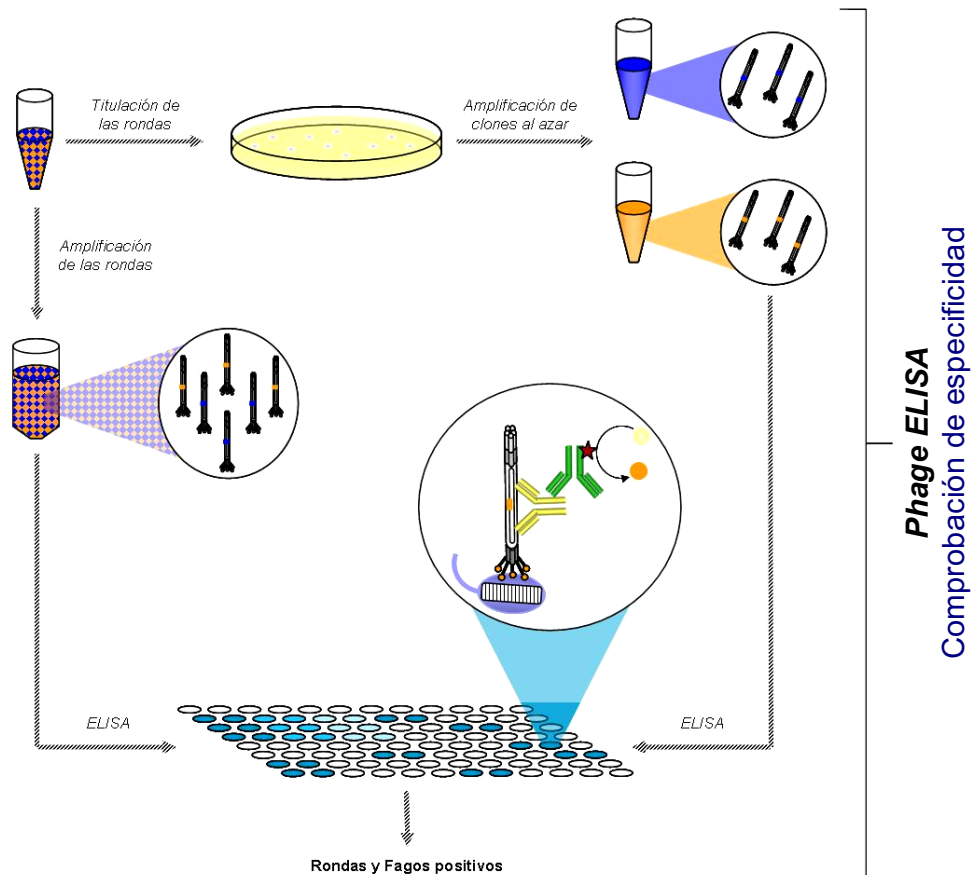


Figura 9. Diagrama simplificado de la comprobación de especificidad de las rondas y clones seleccionados durante el biopanning seguido en la búsqueda de péptidos y *scFv*'s desplegados en fagos capaces de unirse al WSSV. Las rondas de fagos eluidas en el biopanning y posteriormente amplificadas así como algunos clones que se seleccionaron al azar de las cajas de titulación de estas rondas fueron añadidas a título 1 x a pocillos de una microplaca con WSSV inmobilizado. Después de lavar los fagos no unidos se detectaron los fagos que sí se unieron al virus usando un anticuerpo monoclonal anti-M13 producido en ratón y un segundo anticuerpo anti-IgG (H+L) de ratón conjugado a HRP.

VII. RESULTADOS

7.1 Suspensión Viral

La suspensión viral conteniendo el WSSV se obtuvo siguiendo un sencillo método consistente en centrifugación convencional, filtración y una combinación de centrifugación y microfiltración de tejido infectado. Se utilizó tejido de un organismo que tras ser infectado experimentalmente presentó claramente los signos clínicos propios de la enfermedad, murió al segundo día posinfección, fue congelado y después de la confirmación de la infección por PCR fue enviado a las instalaciones del CIBNOR.



Figura 10. Homogenización de Tejido infectado por WSSV usado para la preparación de la SV. El organismo utilizado fue muerto por Síndrome de la Mancha Blanca tras una inyección de inóculo conteniendo partículas virales de WSSV. La coloración rojiza del cuerpo es un signo clínico propio de la enfermedad causada por la expansión de cromatóforos.

7.2 Preparación del antígeno

La cuantificación de proteínas totales de la SV resultó ser de $4.4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Una fracción de SV fue inactivada por calor a 70°C durante 10 min (Chang et al. 1998; Nakano et al. 1998) y ajustada a $1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, para su uso en el biopanning. En el caso de la SV usada en las pruebas de *phage ELISA* se ajustó a $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

7.3 Selección de dodecapéptidos, heptapéptidos y *scFv* específicos contra el WSSV por biopanning contra partículas virales

Con la finalidad de seleccionar la población de fagos que despliegan péptidos y *scFv* que se unen de forma específica a la superficie del WSSV se realizaron tres rondas de biopanning independientes usando librerías de dodecapéptidos, heptapéptidos y *scFv*-IgG desplegados en fagos recombinantes contra una suspensión viral conteniendo viriones de WSSV. Cada ronda obtenida fue amplificada y utilizada en la siguiente ronda de selección para enriquecer la población de fagos más afines por el virus a la vez que la astringencia del proceso fue aumentada progresivamente en cada una de las rondas. Esta selección fue monitoreada titulando los fagos eluidos de los pocillos cubiertos con WSSV en cada una de las rondas del biopanning expresando el título en unidades formadoras de placas o de colonias según correspondió (Figura 11). Se detectó un incremento en el número de fagos eluidos de la primera a la tercera ronda de a u.f.p para dodecapéptidos, a u.f.p. para heptapéptidos mientras que para *scFv*-IgG se apreció un decremento de a u.f.c. tal como se muestra en la tabla I.



Figura 11. Titulación de los fagos y fagémidos. Se realizaron diluciones de los fagos a titular, mismas que fueron utilizadas para infectar bacterias susceptibles. Los títulos se expresan en unidades formadoras de placas en el caso de M13 (A y B) y de unidades formadoras de colonia en el caso del fagémido (C).

Tabla I. Enriquecimiento de los péptidos y *scFv* de las diferentes librerías monitoreado durante el biopanning.

	Dodecapéptidos Ph.D-12			Heptapéptidos Ph.D-C7C			<i>scFv</i>-IgG Naïve		
	Ronda			Ronda			Ronda		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Entrada de fagos	1 x	1 x	1 x	1 x	1 x	1 x	2 x	1 x	1 x
Fagos eluidos	6 x	4 x	1 x	3 x	2 x	2 x	6 x	2 x	2 x
Rendimiento (%)*	6×10^{-5}	4×10^{-4}	1×10^{-4}	3×10^{-4}	2×10^{-4}	2×10^{-3}	3×10^{-5}	2×10^{-5}	2×10^{-4}

* Rendimiento (%) = (no. de fagos eluidos x 100)/(no. de fagos a la entrada)

7.4 Rendimiento de la amplificación de los fagos

Como parte del procedimiento de biopanning los fagos eluidos en cada ronda tuvieron que ser amplificados para su utilización en la siguiente ronda de selección. Para ello ~500 μl de cada ronda se utilizaron para infectar 20 mL de medio de cultivo de *E. coli* en crecimiento logarítmico temprano permitiendo la replicación de los fagos por 4.5 hrs mientras que en el caso del fagémido las bacterias infectadas con el eluido y superinfectadas con fago helper M13KO7 se mantuvieron 18 hrs en 40 mL de medio produciendo progenie. Los fagos fueron purificados, resuspendidos en buffer TBS y mantenidos a 4°C logrando un rendimiento típico de fagos totales y del orden de fagos por mL de medio de cultivo (Tabla II) para todos los casos. A pesar de que las rondas que sirvieron de inóculo contaban con títulos diferentes, la amplificación de los fagos no tuvo diferencia significativa. En el caso de las rondas de Ph.D-*scFv* se guardaron en glicerol a -80°C alícuotas de bacterias infectadas por el fagémido para posteriores usos.

Tabla II. Rendimiento típico obtenido en la amplificación de las rondas del biopanning.

Librería	Ronda I		Ronda II		Ronda III	
	UFP totales	UFP·mL ⁻¹ cultivado	UFP totales	UFP·mL ⁻¹ cultivado	UFC totales	UFC·mL ⁻¹ cultivado
Ph.D-C7C	5.46E+12	2.73E+11	6.60E+12	3.30E+11	2.80E+12	1.40E+11
Ph.D-12	3.80E+12	1.90E+11	3.20E+12	1.60E+11	5.30E+12	1.80E+11
Ph.D- <i>scFv</i>	7.40E+12	1.85E+11	5.28E+12	1.32E+11	7.10E+12	1.90E+11

Una vez concluido el biopanning las rondas previamente amplificadas fueron reamplificadas escalando la replicación a 500 mL de medio de cultivo para ser utilizadas en el *phage ELISA*. Luego de la precipitación de los fagos con PEG/NaCl en todos los casos se pudo apreciar la formación un botón blanco formado con - fagos totales y un rendimiento típico de - fagos por mL de medio de cultivo como lo muestra la Tabla III. En el caso de la ronda II de la librería Ph.D-*scFv* se utilizaron como inóculo las bacterias en glicerol almacenadas a -80°C en lugar del fagémido purificado, observandose el mayor rendimiento del escalamiento, mismo que fue confirmado mediante titulación por plaqueo.

Tabla III. Rendimiento típico en el escalamiento a 500 mL de las rondas del biopanning previamente amplificadas.

Librería	Ronda I		Ronda II		Ronda III	
	UFP totales	UFP·mL ⁻¹ cultivado	UFP totales	UFP·mL ⁻¹ cultivado	UFC totales	UFC·mL ⁻¹ cultivado
Ph.D-C7C	1.30E+14	2.60E+11	1.30E+14	2.60E+11	6.60E+14	1.32E+12
Ph.D-12	1.50E+14	3.00E+11	5.00E+13	1.00E+11	3.50E+15	7.00E+12
Ph.D-scFv	1.00E+14	2.00E+12	4.00E+15	8.00E+12	2.00E+14	4.00E+11

Además se amplificaron 20 unidades formadoras de placas y de colonias tomadas al azar provenientes de la titulación de las rondas II y III de cada librería para someterlos a prueba de *phage ELISA*. Estas ampliificaciones se realizaron en 3 mL de medio con bacterias en crecimiento logarítmico usando unidades formadoras de placa (fago-péptido) mientras que las unidades formadoras de colonia (fago-scFv/fagémido) se cultivaron y superinfectaron con fago helper por 18 hrs en un volumen de 10 mL usando tubos cónicos obteniendo generalmente - fagos purificados con un rendimiento de - fagos por mL de medio cultivado (Tabla IV).



Figura 12. Fotografía del escalamiento a 500 mL de las rondas I a III seleccionadas a partir de la librería Ph.D-C7C. Las células infectadas con fagos fueron mantenidas a 37°C con agitación de 240 rpm por 4.5 hrs. En la fotografía también aparecen las rondas I a III de Ph.D-scFv infectando 50 mL de bacterias para posteriormente rescatar el fagémido con fago helper y cultivar las células superinfectadas en 500 mL de medio.

Tabla IV. Rendimiento típico en la amplificación de Unidades Formadoras de placa y de Colonia tomadas al azar de las placas de titulación de las rondas II y III del biopanning.

Ph.D-C7C		Ph.D-12		Ph.D- <i>scFv</i>	
UFP totales	UFP·mL ⁻¹ cultivado	UFP totales	UFP·mL ⁻¹ cultivado	UFC totales	UFC·mL ⁻¹ cultivado
1.68E+12	5.60E+11	9.00E+11	3.00E+11	1.60E+11	1.60E+10
1.34E+12	4.47E+11	6.90E+11	2.30E+11	1.10E+12	1.10E+11
2.00E+11	6.67E+10	3.51E+11	1.17E+11	2.00E+11	2.00E+10
1.34E+12	4.47E+11	3.99E+11	1.33E+11	8.20E+11	8.20E+10
2.00E+11	6.67E+10	9.90E+11	3.30E+11	3.70E+11	3.70E+10
7.40E+11	2.47E+11	2.01E+12	6.70E+11	2.70E+11	2.70E+10
5.40E+11	1.80E+11	1.71E+12	5.70E+11	3.00E+11	3.00E+10
6.00E+11	2.00E+11	2.55E+12	8.50E+11	4.70E+11	4.70E+10
4.60E+11	1.53E+11	6.60E+11	2.20E+11	1.00E+12	1.00E+11
7.40E+11	2.47E+11	2.07E+12	6.90E+11	2.60E+11	2.60E+10
2.00E+11	6.67E+10	2.61E+12	8.70E+11	1.50E+11	1.50E+10
2.60E+11	8.67E+10	2.75E+12	9.15E+11		
6.00E+11	2.00E+11	9.00E+11	3.00E+11		
2.00E+11	6.67E+10	3.00E+11	1.00E+11		
4.60E+11	1.53E+11	5.10E+11	1.70E+11		
4.00E+11	1.33E+11	3.00E+11	1.00E+11		
4.60E+11	1.53E+11	3.99E+11	1.33E+11		
3.40E+11	1.13E+11	3.00E+11	1.00E+11		
4.40E+11	1.47E+11				
8.00E+11	2.67E+11				
3.60E+11	1.20E+11				
7.30E+11	2.43E+11				

7.5 Comprobación de la especificidad anti-WSSV por prueba de *phage ELISA*

Mediante *phage ELISA* se probó la especificidad de la unión de los péptidos y *scFv* desplegados en fagos tanto de las rondas obtenidas así como de todos los clones tomados al azar de las rondas II y III del biopanning de cada librería hacia el WSSV inmovilizado. Todas las rondas de las tres librerías fueron analizadas en una misma microplaca por duplicado repitiendo el ensayo en dos ocasiones al igual que con los clones. Las lecturas se obtuvieron al observarse el desarrollo del color dentro de los primeros 40 minutos siguientes a la adición del sustrato cromogénico. Este ensayo mostró un incremento de la señal desde la ronda I a la III para todas las librerías tamizadas (Figura 13).

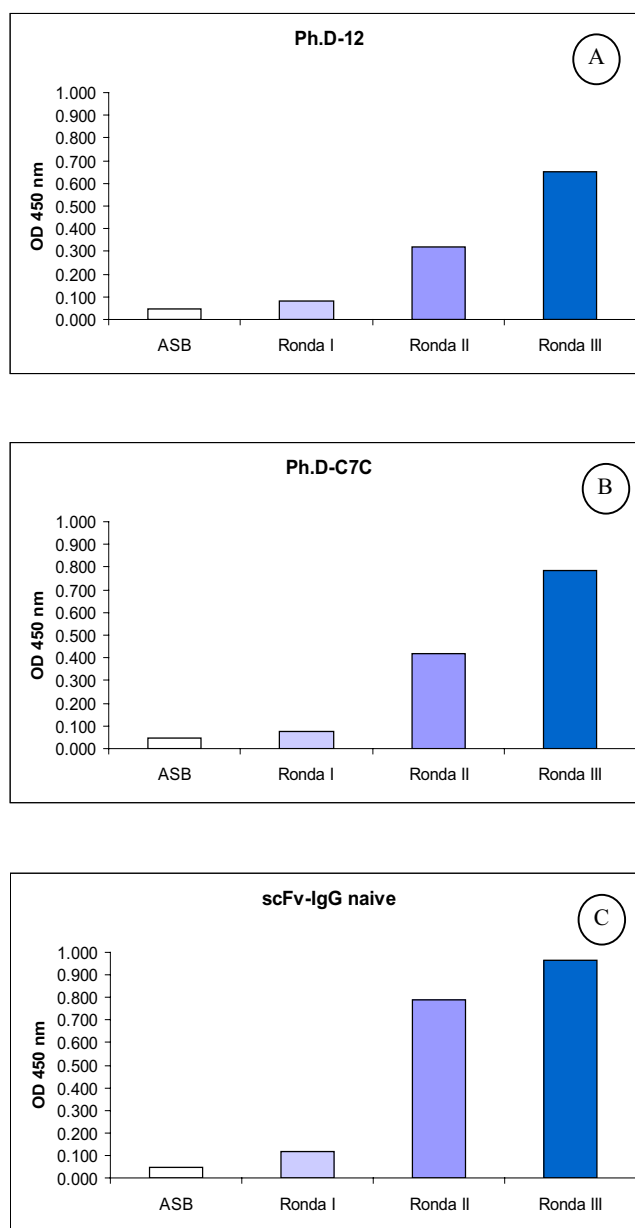


Figura 13. Phage ELISA de las rondas del biopanning amplificadas y ajustadas a fagos. Los (A) dodecapéptidos; (B) heptapéptidos contorneados y (C) *scFv*-IgG desplegados en fagos fueron expuestos a WSSV inmovilizado en microplacas. Los fagos unidos se detectaron usando un primer anticuerpo monoclonal anti-M13 producido en ratón y un segundo anticuerpo anti-ratón conjugado a HRP. Todas las muestras fueron probadas por duplicado y los valores resultantes promedios se presentan en la figura. El valor de la absorbancia para BSA no se restó en ningún caso.

En el caso de los clones sometidos a phage ELISA se consideró resultado positivo aquellas muestras que presentaron al menos dos veces la lectura para ABS inmovilizada considerada como el blanco que fue de 0.042 UA en promedio para los ensayos realizados con péptidos desplegados. El 85% de los 21 diferentes clones que despliegan dodecapéptidos lineales, 16 pertenecientes a la Ronda II y 5 a la Ronda III (Figura 14), resultaron positivos bajo este criterio. Los clones L2.6 y L3.1 de las Rondas II y III, tuvieron las mayores lecturas de absorbancia con 0.442 y 0.594 UA promedio equivalentes a 11 y 14 veces el control respectivamente. El resto de las lecturas se mantuvieron en el rango de 3 y 4 veces la absorbancia del control.

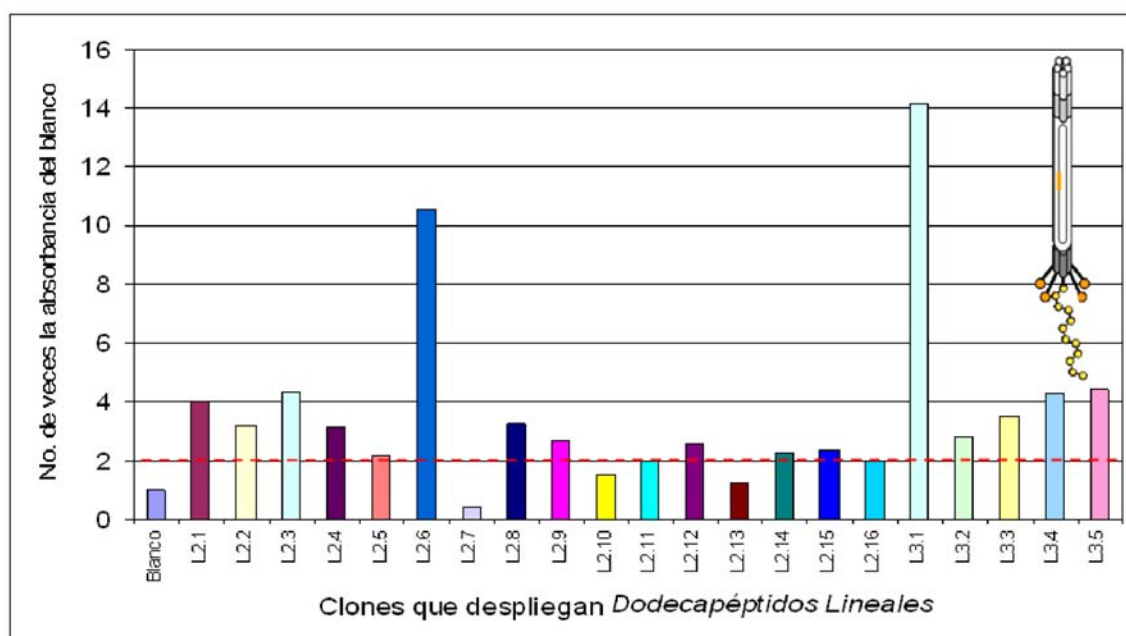


Figura 14. Phage ELISA de los clones aislados al azar de las rondas II y III del biopanning de la librería Ph.D-12. Los clones fueron amplificados y ajustados a un título de UFP para ser expuestos a WSSV inmovilizado en microplacas. Los fagos unidos se detectaron usando un anticuerpo monoclonal anti-M13 conjugado a HRP. Todas las muestras fueron probadas por duplicado y el valor de la absorbancia para BSA no se restó en ningún caso. El valor mostrado para cada clon en la figura está expresado como múltiplos de la lectura obtenida para el control que fue considerada como 1.

El 100% de los 20 clones que despliegan heptapéptidos constreñidos, 10 pertenecientes a la Ronda II y 10 a la Ronda III, resultaron positivos con afinidad por el WSSV. Todas las muestras excepto una perteneciente a la Ronda II superaron tres veces la lectura del blanco. El clon 7C3.4 presentó la mayor lectura de absorbancia con 0.469 UA correspondiente a 11 veces la lectura del blanco seguida de los clones 7C3.1, 7C2.3, 7C3.3, 7C2.4, 7C2.7 con lecturas de 0.371, 0.374, 0.330, 0.311 y 0.319 UA respectivamente. En los clones pertenecientes a la Ronda III todos los valores superaron cuatro veces el control y el 50% se mantuvieron en el rango de 4 a 6 veces.

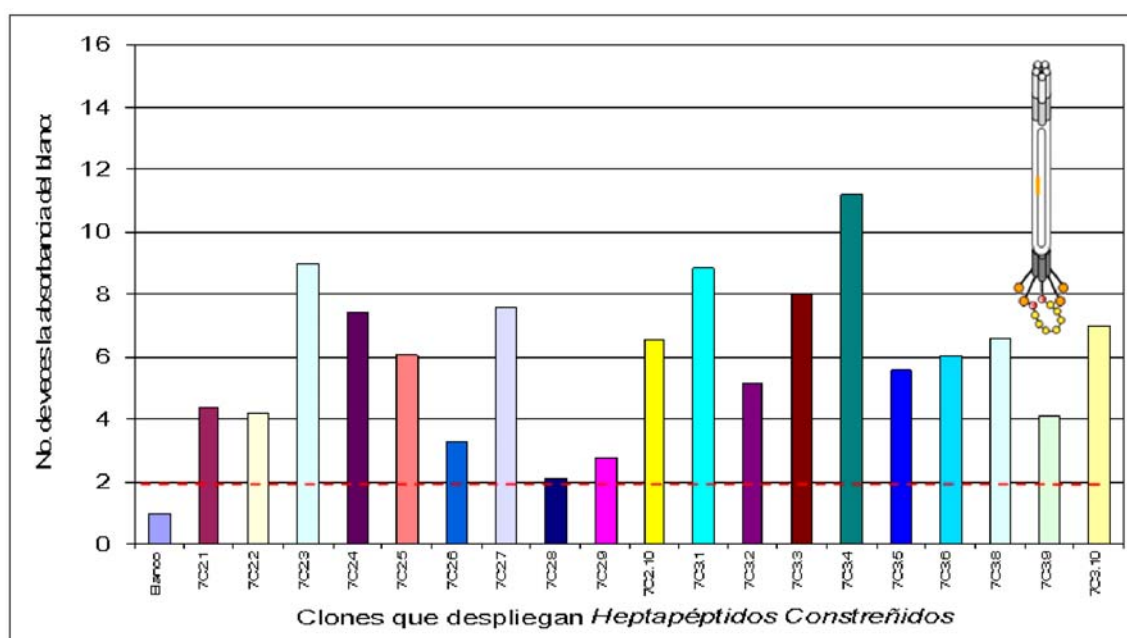


Figura 15. Phage ELISA de los clones que despliegan heptapéptidos constreñidos aislados al azar de las rondas II y III del biopanning de la librería Ph.D-C7C. Los clones fueron amplificados y ajustados a un título de UFP para ser expuestos a WSSV inmovilizado en microplacas. Los fagos unidos se detectaron usando un anticuerpo monoclonal anti-M13 conjugado a HRP. Todas las muestras fueron probadas por duplicado y el valor de la absorbancia para BSA no se restó en ningún caso. El valor mostrado para cada clon en la figura está expresado como múltiplos de la lectura obtenida para el control que fue considerada como 1.

Solo el 36.4% de los clones que despliegan scFv resultaron positivos bajo el criterio de evaluación siendo los clones S2.1, S3.3, S3.11 y S3.12 los que presentaron las mayores lecturas de absorbancia con 2.02, 2.05, 2.06 y 2.09 UA respectivamente.

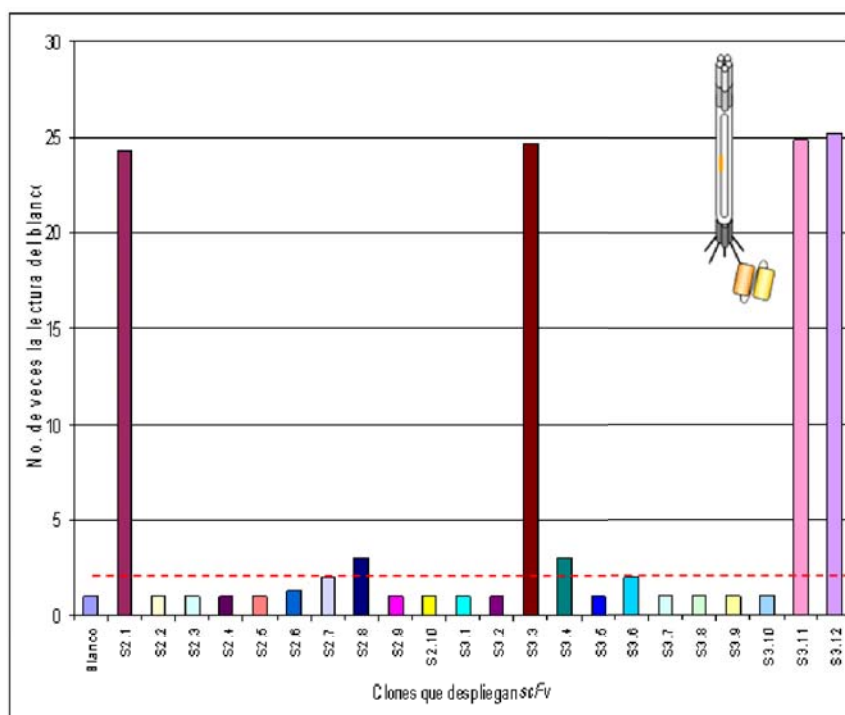


Figura 16. Phage ELISA de los clones que despliegan scFv aislados al azar de las rondas II y III del biopanning de la librería Ph.D-scFv. Los clones fueron amplificados y ajustados a un título de UFC para ser expuestos a WSSV inmovilizado en microplacas. Los fagos unidos se detectaron usando un anticuerpo monoclonal anti-M13 conjugado a HRP. Todas las muestras fueron probadas por duplicado y el valor de la absorbancia para BSA no se restó en ningún caso. El valor mostrado para cada clon en la figura está expresado como múltiplos de la lectura obtenida para el control que fue considerada como 1.

VIII. DISCUSIÓN

Hasta el día de hoy el virus del síndrome de la mancha blanca continúa siendo el principal patógeno del camarón en cultivo (Flegel y Sritunylucksana, 2010). Debido a que no hay disponible ningún tratamiento efectivo para su control, provoca una alta tasa de mortandad, se ha diseminado rápidamente entre los principales países productores y a que existe un alto riesgo de infección se le considera una seria amenaza para el crecimiento y sobrevivencia de la industria (Chen et al., 2010; Escobedo-Bonilla et al., 2008). Dada la carencia de un sistema inmune específico y de memoria en el camarón (Lee y Söderhäll, 2002; Smith et al., 2003) que pudiera prevenir la infección por el virus mediante la vacunación convencional, es necesario encontrar estrategias alternativas para su control. Algunas enfermedades de humanos y de mamíferos han sido controladas con el uso de anticuerpos o proteínas/péptidos con varios grados de éxito incluyendo el tratamiento de infecciones de origen viral y bacteriano (Juliano et al., 2001; Tran et al., 2009). Así mismo, por su gran especificidad y afinidad los anticuerpos son utilizados en el desarrollo de tecnologías para el diagnóstico de enfermedades en formatos tales como ELISA, inmunofluorescencia, western blot, inmunodifusión, inmuno-PCR entre otras. En este sentido, *el phage display* es una técnica ampliamente utilizada para el descubrimiento de péptidos y anticuerpos con alta especificidad y afinidad por una molécula blanco de interés.

En el presente trabajo se seleccionaron por primera vez una variedad de péptidos y fragmentos de anticuerpos humanos anti-WSSV desplegados en fagos a partir de librerías prefabricadas de origen no inmune de dodecapéptidos lineales, heptapéptidos constreñidos y *scFv*'s. Las librerías de origen no inmune o *naïve* son construidas para seleccionar anticuerpos o péptidos que se unan a cualquier antígeno, razón por la cual se les considera de uso universal (Sidhu, 2000). De esta forma, se pudieron encontrar péptidos y *scFv*'s capaces de unirse al virión del WSSV sin la necesidad de realizar una inmunización o el previo conocimiento de la existencia o la naturaleza de esta interacción imitando de forma artificial el proceso de selección clonal del sistema inmune (Arap, 2005; Winter et al., 1994).

Durante el proceso de biopanning o tamizado de las librerías se logró enriquecer la población de fagos afines por el WSSV (Tabla I). Esto quedó demostrado a través del incremento en el título de los fagos eluidos en cada una de las rondas. La dilución seriada de los virus (como los fagos) permite su cuantificación indirecta gracias a que al infectar a su huésped (una bacteria susceptible) una placa en el cultivo representa la infección por un único virión, así como en el caso de fagémido donde la selección con antibiotico permite el conteo de colonias que representan una célula transformada, de tal manera que el número de placas o colonias refleja el número de fagos infectivos (Yi et al., 2003). Esta forma de evaluar el enriquecimiento presenta un sesgo ya que tiene una confianza del 50% (NEB), de ahí que el decremento observado en el título de la Ronda I a la III de la librería de Ph.D-*scFv* pudiera no ser tal. Otra forma de evaluar este enriquecimiento consiste en medir mediante un inmunoensayo la unión de los péptidos o scFv desplegados al WSSV donde el aumento de la señal en todos los casos, desde la ronda I a la III (Figura 12), supone un incremento en el número de fagos específicos y por tanto un enriquecimiento de las secuencias más afines por el WSSV en cada uno de los casos sin excepción. Durante la primera ronda de selección, la baja astringencia del proceso (número de lavados) favorece la selección de fagos en un amplio rango de afinidades dado que el biopanning no discrimina entre uniones de afinidad moderada o alta (Vispo y Puchades, 2001). De ahí que al aumentar la astringencia paulatinamente durante el biopanning, no se observó un marcado incremento del título entre la ronda I y la ronda II pero, al momento de realizar el *phage ELISA* bajo las mismas condiciones de astringencia para ambas rondas, la ronda II muestra un conspicuo incremento en la señal dada por el enriquecimiento de los fagos más afines. Esta tendencia continúa al comparar las rondas II y III, sin embargo, la diferencia entre los valores no es tan sobresaliente debido a que el mismo proceso va seleccionando los fagos con mayor afinidad gracias a que en cada ronda se va depurando la selección al eliminar los fagos menos afines y propagar los más para introducirlos a la siguiente ronda de biopanning. El que las rondas II y III de la librería Ph.D-*scFv* presenten valores más cercanos entre sí indica que se alcanzó el punto de saturación (Arap, 2005; Yi et al., 2003).

Además debe tomarse en cuenta que durante el biopanning pueden seleccionarse fagos con alta afinidad pero con desventajas para su propagación que hagan que no prevalezcan en la siguiente ronda (Yang y Nolan, 2007). El rendimiento típico de fagos por mL de medio cultivado obtenido durante la propagación de los fagos coincide con la reportada en la literatura (Manoutcharian, 2005; Vispo y Puchades, 2007). La ventaja que presenta la propagación del fago-péptido sobre el fago-*scFv*/fagémido tiene que ver con que éste solo requiere 4.5 hrs de cultivo mientras que al fago-*scFv*/fagémido le toma 18 hrs en un mayor volumen de medio de cultivo y necesita la adición del fago *helper*. Además, se observó un rendimiento de en la multiplicación de los clones de fago-*scFv*/fagémido que cae dentro de lo reportado (-) y que puede deberse a las condiciones de cultivo y a que algunos *scFv* son tóxicos para la célula por lo que su producción será menor (Manoutcharian, 2005).

La especificidad de la unión de los péptidos y *scFv* desplegados en los fagos se determinó por *phage ELISA*. La mayoría de los fago-péptidos analizados resultaron positivos superando por mucho el criterio de evaluación mientras que el número de fago-*scFv*/fagémido positivos fue inferior en cantidad pero superior en la señal obtenida. Estos resultados concuerdan con los obtenidos durante el *phage ELISA* de las rondas del biopanning ya que los resultados demuestran que mientras el 85% de los fago-dodecapéptidos son positivos, el 100% de los fago-heptapéptidos lo son. A pesar de que solo el 36.4% de los fago-*scFv*/fagémido resultaron positivos, los valores de las rondas de la librería Ph.D-*scFv* se encuentran en el rango obtenido para las rondas de péptidos debido a que el 50% de estos son al menos cuatro veces las mayores lecturas obtenidas para fago-péptidos. Los datos muestran que los clones que despliegan dodecapéptidos L2.6 y L3.1; heptapéptidos 7C2.3, 7C2.4, 7C2.7, 7C3.1, 7C3.3 y 7C3.4 y *scFv* S2.5, S3.3, S3.11 y S3.12 son los candidatos potenciales para ser usados como herramientas contra el virus ya que son los que presentaron las mayores unidades de absorbancia durante el *phage ELISA* de cada una de las librerías tamizada.

Para determinar cuál de las librerías utilizadas tiene mayor afinidad por el WSSV habría que considerar la valencia del péptido desplegado. La gran mayoría de los fagos-*scFv*/fagémido son monovalentes y solo una fracción muy pequeña son polivalentes mientras que la inmensa mayoría de los fagos-péptido son polivalentes pues expresan cada uno cinco copias de un mismo péptido (NEB). La monovalencia de los fagos-*scFv*/fagémido permite la selección de *scFv*'s de alta afinidad por la minimización de los efectos de la avidéz. Sin embargo, esa misma avidéz causa una mayor sensibilidad al detectar uniones de baja afinidad (Seergeva et al., 2006).

Al utilizar el virión completo de WSSV, la técnica de selección se vuelve sensible a la densidad de antígeno sobre su superficie (la probabilidad de seleccionar péptidos o *scFv* contra antígenos que se expresan a niveles bajos es menor) y a la accesibilidad del mismo. Las proteínas que muestran segmentos transmembranosos pequeños resultan blancos difíciles para los anticuerpos pero no así para los péptidos desplegados (Hoogenboom et al., 1999). Una ventaja del uso del virión completo es que permite que algunos de los péptidos o *scFv* se unan a proteínas consideradas menores debido a que son relativamente menos abundantes o bien que se unan a aquellas que aún no han sido caracterizadas ya que se predice que el WSSV codifica alrededor de 100 proteínas estructurales y solo han sido caracterizadas 58 (Chang et al., 2010). Las proteínas estructurales son las primeras moléculas que interactúan con el hospedero (Tsai et al., 2006), participan en la adhesión celular, la transducción de señales, la penetración del virión a la célula hospedera y en la evasión de las defensas antivirales del organismo (Li et al., 2006). El bloqueo de estas proteínas es un posible método para el control de la infección (Bustillos-Ruiz et al., 2009).

Dada la especificidad observada de los fago-péptidos y fago-*scFv*/fagémido por el virión del WSSV se puede pensar en su utilización biotecnológica como posibles neutralizantes del virus. En general, la efectividad de los péptidos y los *scFv* como antivirales radica en su habilidad para unirse a sitios activos o biológicamente relevantes de las proteínas blanco logrando bloquearlas. Por otro lado, es sabido que algunas proteínas de cubierta de los virus pueden interactuar con otras proteínas estructurales resultando en cambios de la morfología

del virus que permite su acoplamiento a los receptores de superficie celular (Bustillos-Ruiz et al., 2009). Los mecanismos involucrados en la infección del WSSV son poco conocidos al igual que la actividad de sus proteínas estructurales (Flegel y Sritunyalucksana, 2010). Los péptidos y *scFv* pueden bloquear una infección viral bloqueando las proteínas claves para la infección o alterando la morfología del virus impidiendo que se acople a sus receptores. Se ha comprobado que algunas de las proteínas del WSSV interactúan entre sí (Xie y Yang, 2006). El número de residuos críticos para la unión a una proteína puede ser muy pequeño por lo que si el péptido posee el número de residuos críticos requeridos lograrán la unión. Muchas compañías farmacéuticas utilizan el *phage display* para el descubrimiento de péptidos y anticuerpos basándose en estas propiedades (Drews, 2000). La unión del péptido a la proteína dependerá no solo de la estructura primaria del péptido sino también de su configuración tridimensional ya que existen epítomos continuos y discontinuos. Los epítomos continuos se encuentran formados de residuos adyacentes mientras que los discontinuos involucran residuos separados ampliamente en la secuencia primaria de la proteína pero unidos espacialmente en la proteína plegada (Arap, 2005). Por esta razón y por la carencia de información sobre los detalles estructurales de todas las proteínas con que se iba a interactuar se optó por utilizar diferentes librerías. Las librerías lineales se encuentran libres de asumir múltiples conformaciones por lo que generalmente se encuentran más clones positivos para epítomos lineales que cuando se usan librerías constreñidas. Sin embargo, para algunas moléculas blanco las librerías constreñidas han funcionado mejor que las lineales ya que el péptido no es libre de asumir cualquier conformación por lo que si se encuentran péptidos positivos probablemente tendrán mayor afinidad por el blanco que uno lineal (Vispo y Puchades, 2007). Este fue el caso de las librerías de dodecapéptidos lineales y heptapéptidos constreñidos, donde estos últimos resultaron con un mayor número de clones positivos que en general mostraron una mayor afección por el WSSV.

Una población de fagos que exponen distintos anticuerpos en sus superficies y que reconocen diferentes epítomos de un mismo antígeno, como en el caso de las rondas eluidas, equivale a anticuerpos policlonales. La potencialidad de estas rondas como neutralizantes

queda manifiesta con trabajos previos con anticuerpos policlonales contra proteínas virales que han logrado una supervivencia aumentada de los organismos retados (Ha et al., 2008, Mustahq et al., 2006). Así mismo, un clon que expone solamente un *scFv* en su superficie equivale a un anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos monoclonales completos y *scFv* han probado su efecto neutralizante sobre el WSSV (Wu et al., 2005, Yuan et al., 2006) y su utilidad como reactivos en pruebas inmunológicas (Intorasoot et al., 2007, Takahashi et al., 2003).

Tanto los péptidos como los *scFv* desplegados en fagos que fueron seleccionados en base a la especificidad de unión a proteínas estructurales del WSSV deben ser probados mediante bioensayos para saber si son capaces de neutralizar al virus puesto que no todas las proteínas estructurales participan directamente en el proceso infectivo como es el caso de la proteína VP292 (Vaseeharan et al., 2006; Wu et al., 2005).

El formato para la utilización de estas herramientas biotecnológicas se determinará dependiendo el uso que se les quiera dar, ya sea como terapia o como reactivo. Si se desean usar los péptidos y *scFv* como terapia se tiene la opción de utilizar al fago como agente de liberación y coadyuvante (Manoutcharian, 2005) o si se desea se puede producir solo el péptido o *scFv* para la determinación de su constante de afinidad y posterior uso como terapia o como reactivo para la investigación o detección del virus.

IX. CONCLUSIONES

1. Existen dodecapéptidos lineales, heptapéptidos constreñidos y *scFv* desplegados en fagos que se unen específicamente al WSSV.
2. El biopanning permitió enriquecer la población de fagos más afines por el WSSV.
3. Las Rondas III seleccionadas durante el biopanning equivalen a antisueros anti-WSSV.
4. Los *scFv* desplegados en los clones S2.1, S3.3, S3.11 y S3.12 son anticuerpos monoclonales que se unen específicamente y con gran afinidad al WSSV que podrían utilizarse en el desarrollo de inmunoensayos para el diagnóstico o el estudio del virus.
5. Los clones que despliegan **dodecapéptidos** L2.6 y L3.1; **heptapéptidos** 7C2.3, 7C2.4, 7C2.7, 7C3.1, 7C3.3 y 7C3.4 y **scFv** S2.5, S3.3, S3.11 y S3.12 son potenciales neutralizantes del WSSV dada su especificidad por el virus.
6. Los clones seleccionados serán neutralizantes del WSSV si se unen a proteínas claves para la infección por lo que se requiere experimentación para determinar cuál de los clones podría ser el mejor neutralizante del virus.

X. PERSPECTIVAS

Este trabajo abre la puerta a la búsqueda de aplicaciones biotecnológicas para los fago-péptidos y fago-scFv/fagémido seleccionados. El próximo paso será la confirmación de que estos pueden ser neutralizantes del WSSV mediante un bioensayo donde los fagos recombinantes serán incubados con WSSV activo para retar camarones *Litopenaeus vannamei*. La sobrevivencia o el grado de infección de los organismos retados aportara evidencia del posible uso de esta tecnología como nuevos biofármacos contra el virus.

XI. LITERATURA CITADA

- @Author. 2004. 00.103.0.01.001. White spot syndrome virus 1. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 3. Büchen-Osmond, C. (Ed), ICTVdB Management, Columbia University, New York, USA
- Arap, W., Haedicke, W., Bernasconi, M., Kain, R., Rajotte, D., Krajewski, S., Ellerby, H.M., Bredesen, D.E., Pasqualini, R., Ruoslahti, E. 2002. Targeting the prostate for destruction through a vascular address. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:1527-1531.
- Arap, M.A. 2005. Phage display technology-Applications and innovations. *Genetics and Molecular Biology*. 28(1):1-9
- Balasubramanian, G., Sarathi, M., Kumar, S.R., Sahul Hameed, A.S. 2007. Screening the antiviral activity of Indian medicinal plants against white spot syndrome virus in shrimp. *Aquaculture* 263, 15-19.
- Balasubramanian, G., Sarathi, M., Venkatesan, C. 2008. Oral administration of antiviral plant extract of *Cynodon dactylon* on a large scale production against White spot syndrome virus (WSSV) in *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 279(1-4): 2-5
- Bondad-Reantaso, M.G., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, R., Tan, Z., Shariff, M. 2005. Disease and health management in Asian Aquaculture. *Vet. Parasitol.* 132, 249-272.
- Bustillo-Ruiz, M.I., Escobedo-Bonilla, C.M., Sotelo-Mundo, R.R. 2009. Revisión de patogénesis y estrategias moleculares contra el virus del síndrome de la mancha blanca en camarones peneidos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 44(1): 1-11.
- Caipang, C.M.A., Verjan, N., Ooi, E.L. 2008. Enhanced survival of shrimp, *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* from white spot syndrome disease after oral administration of recombinant VP28 expressed in *Brevibacillus brevis*. *Fish & Shellfish Immunology* 25(3): 315-320
- Chang, C.F., Su, M.S., Chen, H.Y., Liao, I.C. 2003. Dietary β -1,3- glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology* 15(4): 297-310
- Chang, Y.S., Liu, W.J., Lee, C.C., Chou, T.L., Lee, Y.T. 2010. A 3D Model of the Membrane Protein Complex Formed by the White Spot Syndrome Virus Structural Proteins. *PLoS ONE* 5(5): e10718. doi:10.1371/journal.pone.0010718

- Chang, P.S., Chen, L.J., Wang, Y.C. 1998. The effect of ultraviolet irradiation, heat, pH, ozone, salinity and chemical disinfectants on the infectivity of white spot syndrome baculovirus. *Aquaculture* 166, 1-17.
- Chen, J.Y., Anbarasu, K., Chen, Ch.Y., Lee, Y.Ch, Nan, F.H., Kuo, Ch.M. 2010. Passive immunity to white spot syndrome virus (WSSV) in *Penaeus monodon* with monoclonal antibodies of the heterologously produced VP28 viral envelope protein. *Journal of Marine Science and Technology* 18(1): 145-152.
- Cheng, X., Kay, B.K., Juliano, R.L. 1996. Identification of a biologically significant DNA-binding peptide motif by use of a random phage display library. *Gene* 171:1-8.
- Cwirla, S.E., Peters, E.A., Barnett, R.W., Dower, W.J. 1990. *Proc Natl Acad Sci.* 87: 6378-6382.
- Dai, H.P., Gao, H., Zhao, X.Y., Dai, L.F., Zhang, X.K., Xiao, N., Zhao, R.H., Hemmingsen, S.M. 2003. Construction and characterization of a novel recombinant single-chain variable fragment antibody against White Spot Syndrome Virus from shrimp. *Journal of Immunological Methods* 279(1-2): 267-275
- Drews, J. 2000. Drug discovery: a historical perspective. *Science.* 287, 1960–1964.
- Du, H.H., Xu, Z.R., Wu, X.F. 2006. Increased resistance to white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii* by injection of envelope protein VP28 expressed using recombinant baculovirus. 260(1-4): 39-43
- Ehrlich, G. K. y Bailon, P. 2001. Identification of model peptides as affinity ligands for the purification of humanized monoclonal antibodies by means of phage display. *J Biochem Biophys Methods* 49: 443–454.
- Escobedo-Bonilla, C.M., Alday-Sanz, V., Wille, M., Sorgeloos, P., Pensaert, M., Nauwynck, H.J. 2008. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of White spot syndrome virus. *Journal of Fish Diseases*, 31: 1-18.
- FAO fisheries department, fisheries information, data and statistics unit. 2005. Fishstat, universal software for fishery statistical time series. Version 2.3
- Flegel, T.W. y Fegan, D.F. 2002. Marine shipping could ballast water and hull fouling be a fomite for disease transmission? In: *Proceedings of the Conference on World Aquaculture* (ed. by The World Aquaculture Society), p. 226. The World Aquaculture Society, Beijing, China.
- Flegel, T.W. y Sritunylucksana, K. 2010. Shrimp Molecular Responses to Viral Pathogens. *Mar Biotechnol.* DOI 10.1007/s10126-010-9287-x

- Flegel, T.W., Lightner, D.V., Lo, C.F., Owens, L. 2008. Shrimp disease control: past, present and future. In: Bondad-Reantaso MG, Mohan CV, Crumlish M, Subasinghe RP (eds) Diseases in Asian aquaculture VI. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, pp 355–378
- Galavíz-Silva, L., Molina-Garza, Z.J., Tirado-Velarde, M.S., Ibarra-Gámez, J.C. 2004. Vacunas contra el síndrome de la mancha blanca (WSSV) en camarón. Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico. 2 (26):4-6
- Gracia-Valenzuela, M.H., Coronado-Molina, D., Hernández-López, J. y Gollas-Galván, T.. 2009. A simple method for purifying the White Spot Syndrome Virus using ultrafiltration. *Aquaculture Research* 40, 737-743
- Ha, Y.M., Kim, Y.I., Kim, K.H. 2008. Neutralization of white spot syndrome virus (WSSV) for *Penaeus chinensis* by antiserum raised against recombinant VP19. *Journal of Environmental Biology* 29(4): 513-517
- Hoogenboom, H.R., Lutgerink, J.T., Pelsers, M.M., Rousch, M.J., Coote, J., Van Neer N. 1999. Selection-dominant and nonaccessible epitopes on cell-surface receptors revealed by cellpanning with a large phage antibody library. *Eur J Biochem* 260:774-84.
- Jiang, Y.S., Zhan, W.B, Sheng, X.Z. 2007. Neutralizing assay of monoclonal antibodies against white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture* 272(1-4): 216-222
- Jiang, G., Yu, R., Zhou, M. 2004. Modulatory effects of ammonia-N on the immune system of *Penaeus japonicus* to virulence of white spot syndrome virus. *Aquaculture* 241, 61-75.
- Juliano, R.L., Astriab-Fisher, A., Falke, D. 2001. Macromolecular therapeutics. *Mol Interv* 1, 40–53.
- Kim, D.K., Jang, I.K., Seo, H.C., Shin, S.O., Yang, S.Y., Kim, J.W. 2004. Shrimp protected from WSSV disease by treatment with egg yolk antibodies (IgY) against a truncated fusion protein derived from WSSV. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.03.015
- Kolonin, M.G, Saha, P.K, Chan, L., Pasqualini, R., Arap, W. 2004. Reversal of obesity by targeted ablation of adipose tissue. *Nat Med* 10:625-632.
- Lee, S.Y. y Söderhäll, K. 2002. Early events in crustacean innate immunity. *Fish & Shellfish Immunol.* 12, 421-437.
- Lesinski, G. B. y Westerink, J. 2001. Novel vaccine strategies to T-independent antigens. *J Microbiol Methods* 47, 135–149.

- Li, L.J., Yuan, J.F., Cai, C.A., Gu, W.G., Shi, Z.L. 2006. Multiple envelope proteins are involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection in crayfish. *Archives of Virology* 151, 1309–1317.
- Li, L., Xie, X., Yang, F. 2005. Identification and characterization of a prawn white spot syndrome virus gene that encodes an envelope protein VP31. *Virology* 340, 125-32.
- Lightner, D.V. 2005. Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World. Aquac. Soc.* 36, 229-247
- Liu, H., Söderhäll, K., Jiravanichpaisal, P. 2009. Antiviral immunity in crustaceans. *Fish & Shellfish Immunology* 27(2): 79-88
- Lotz, J.M. y Soto, A.M. 2002. Model of white spot syndrome virus (WSSV) epidemics in *Litopenaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 50, 199–209.
- Lu, Y., Liu, J., Jin, L., Li, X., Zhen, Y., Xue, H., You, J., Xu, Y. 2008. Passive protection of shrimp against white spot syndrome virus (WSSV) using specific antibody from egg yolk of chickens immunized with inactivated virus or a WSSV-DNA vaccine *Fish & Shellfish Immunol*, 25(5):604-610
- Lu, Y., Liu, J., Jin, L., Lin, X., Zhen, Y., Xue, H., Lin, Q., Xu, Y. 2009. Passive immunization of crayfish (*Procambarus clarkii*) with Chicken egg yolk immunoglobulin (IgY) against White spot syndrome virus (WSSV). *App Biochem Biotechnol*, PMID: 19238337
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 2004. *Brock: Biología de los Microorganismos*. Pearson-Prentice Hall. España. 766 y 770 pp
- Manoutcharian, K. 2005. Bacteriophages as tools for vaccine and drug development. *Expert Rev. Vaccines* 4(1):5-7
- Morales, J., Martínez, J.J., Manoutcharian, K., Hernández, M., Fleury, A., Gevorkian, G., Acero, G., Blancas, A., Toledo, A., Cervantes, J., Maza, V., Quet, F., Bonnabau, H.S., de Aluja, A., Fragoso, G., Larralde, C., Sciutto, E.. 2008. Inexpensive anti-cysticercosis vaccine: S3Pvac expressed in heat inactivated M13 filamentous phage proves effective against naturally acquired *Taenia solium* porcine cysticercosis. *Vaccine*. 26(23): 2899-2905
- Musthaq, S., Syed, Yoganandhan, K., Sudhakaran, R., Rajesh, Kumar, S., Sahul, Hameed A.S. 2006. Neutralization of white spot syndrome virus of shrimp by antiserum raised against recombinant VP28. *Aquaculture* 253(1-4): 98-104

- Nakano, H., Hiraoka, M., Sameshima, M., Kimura, T., Momoyama, K. 1998. Inactivation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), the causative agent of penaeid acute viremia (PAV), by some chemical and physical treatments. *Fish Pathol.* 33, 65-71.
- Namikoshi, A., Wu, J.L., Yamashita, T., Nishizawa, T., Nishioka, T., Arimoto, M., Muroga, K. 2004. Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. *Aquaculture* 229, 25-35.
- Natividad, K.D.T., Hagio, M., Tanaka, M., Nombra, N., Matsumura, M. 2007. White spot syndrome virus (WSSV) inactivation in *Penaeus japonicus* using purified monoclonal antibody targeting viral envelope protein. *Aquaculture* 269:54-62
- Noda, K., Yamasaki, R., Hironaka, Y., Kitagawa, A. 2001. Selection of peptides that bind to the core oligosaccharide of R-form LPS from a phage-displayed heptapeptide library. *FEMS Microbiol Lett* 205:349-354
- Noren, Ch. F. 1996. Phage Display: Affinity Selection Linked to Genetic Information. A Scientific Newsletter from New England Biolabs.
- Pasqualini, R., Kovunen, E., Kain, R., Lahdenranta, J., Sakamoto, M., Stryhn, A., Ashmun, R.A., Shapiro, L.H., Arap, W., Ruoslahti, E. 2000. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res* 60:722-727
- Pholdaeng, K., Pongsamart, S. 2010. Studies on the immunomodulatory effect of polysaccharide gel extracted from *Durio zibethinus* in *Penaeus monodon* shrimp against *Vibrio harveyi* and WSSV. *Fish & Shellfish immunology* 28(4): 555-561
- Rahman, M.M., Escobedo-Bonilla, C.M., Wille, M., Alday-Sanz, V., Audoorn, L., Neyts, J., Pensaert, M.B., Sorgeloos, P., Nauwynck, H.J. 2006. Clinical effect of cidofovir and a diet supplemented with *Spirulina platensis* in white spot syndrome virus (WSSV) infected specific pathogen-free *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture* 255(1-4): 600-605
- Rameshthangam, P. y Ramasamy, P. 2007. Antiviral activity of bis(2-methylheptyl)phthalate isolated from *Pongamia pinnata* leaves against White Spot Syndrome Virus of *Penaeus monodon* Fabricius. *Virus Research* 126(1-2): 38-44
- Rhyner, C., Weichel, M., Fluckiger, S., Hemmann, S., Kleber-Janke, T., Cramer, R. 2004. Cloning allergens via phage display. *Methods* 32:212-218.
- Rodi, D.J., Janes, R.W., Sanganee, H.J., Holton, R.A., Wallace, B.A., Makowski, L. 1999. Screening of a library of phagedisplayed peptides identifies human bcl-2 as a taxol-binding protein. *J Mol Biol* 285:197-203.

- Rogers, B.E., Douglas, J.T., Sosnowsky, B.A., Ying, W., Pierce, G.F., Buchsbaum, D.J., Manna, D.D., Baird, A., Curiel, D.T. 1998. Enhanced in vivo gene delivery to human ovarian cancer xenografts utilizing a tropism-modified adenovirus vector. *Tumor Targeting* 3:25-31.
- Ruan, Y.H., Kuo, C.M., Lo, C.F., Lee, M.H., Lian, J.L., Hsieh, S.L. 2010. Ferritin administration effectively enhances immunity, physiological responses, and survival of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with white spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology* 28(4):542-548
- Satoh, J., Nishizawa, T., Yoshimizu, M. 2008. Protection against white spot syndrome virus (WSSV) infection in *kuruma shrimp* orally vaccinated with WSSV rVP26 and rVP28. *Diseases of Aquatic Organism* 82(2): 89-96
- Sergeeva, A., Kolonin, M.G., Molldrem, J.J., Pasqualini. 2006. Display Technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. *Adv Drug Deliv Rev* 58(15): 1622-1654.
- Sidhu, SS. 2000. Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. 11:610-616.
- Smith, G.P. y Petrenko, VA. 1997. Phage Display. *Chem Rev.* 97: 391-410
- Smith, G.P. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. 228: 1315-1317
- Smith, V.J., Brown, J.H., Hauton, C. 2003. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? *Fish Shellfish Immunol.* 15, 71-90.
- Takahashi, Y., Fukuda, K., Kondo, M., Chongthaleong, A., Nishi, K., Nishimura, M., Ogata, K., Shinya, I., Takise, K., Fujishima, Y., Matsumura, M. 2003. Detection and prevention of WSSV infection in cultured shrimp. *Asian Aquaculture Magazine*. November-December 25-27.
- Tran, M., Zhou, B., Petterson, P.L., Gonzalez, M.J., Mayfield, S. 2009. Synthesis and Assembly of a Full-Length Human Monoclonal Antibody in Algal Chloroplasts. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 104, No.4, 663-673.
- Tsai, J.M., Wang, H.C., Leu, J.H., Hsiao, H.H., Wang, A.H., Kou, G.H., Lo, C.F. 2004. Genomic and proteomic analysis of thirty-nine structural proteins of shrimp white spot syndrome virus. *J. Virol.* 11360-70.
- Vaseeharan, B., Anand, T.P., Murugan, T., Chen, J.C. 2006. Shrimp vaccination trials with the VP292 protein of white spot syndrome virus. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 137-142.

- Vispo, N.S. y Puchades, Y. 2001. Bacteriófagos: de la terapia con fagos a la biología combinatoria. *Biotecnología Aplicada* 2001; 18: 135-147
- Wang, S., Humphreys, E.S., Cheng, S.Y., Delduco, D.F., Lustig, S.R., Wang, H., Parker, K.N., Rizzo, N.W., Subramoney, S., Chiang, Y.M., Jagota, A. 2003. Peptides with selective affinity for carbon nanotubes. *Nat Mater* 2:196-2000
- Wang, Y.Z., Zhang, X.H., Yuan, L., Xu, T., Rao, Y., Li, J., Dai, H.P. 2008. Generation of recombinant monoclonal antibodies to study structure-function of envelope protein VP28 of white spot syndrome virus from shrimp. *Biochemical and biophysical research communications* 372(4):902-906
- Wang, Y.N.; Zhan, W.B.; Xing, J. 2008b. In vivo neutralization assays by monoclonal antibodies against white spot syndrome virus in crayfish (*Cambarus proclarkii*). *Acta Oceanológica Sinica* 27(2): 126-132
- Westenberg, M., Heinhuis, B., Zuidema, D., Vlak, J.M. 2005. siRNA injection induces sequence-independent protection in *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus. *Virus Research*. 114(1-2): 133-139
- Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E., Hoogenboom, H.R. 1994. Making Antibodies by Phage Display Technology. *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-55
- Wu, W., Wang, L., Zhang, X. 2005. Identification of white spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection. *Virology* 332, 578–583.
- Wu, Y., Lü, L., Yang, L.S., Weng, S.P., Chan, S.M., He, J.G. 2007. Inhibition of white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei* shrimp by sequence-specific siRNA. *Aquaculture* 271(1-4): 21-30
- Xie, X. y Yang F. 2006. White spot syndrome virus VP24 interacts with VP28 and is involved in virus infection. *Journal of General Virology* 87, 1903–1908.
- Xu, J., Han, F., Zhang, X. 2007. Silencing shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes by siRNA. *Antiviral Res.* 73, 126-131.
- Yang, L. y Nolan J.P. 2007. High-throughput screening and characterization of clones selected from phage display libraries. *Cytometry Part A* 71A:625-631.
- Yi, G., Wang, Z., Qi, Y., Yao, L., Qian, J., Hu, L. 2004. VP28 of shrimp white spot syndrome virus is involved in the attachment and penetration into shrimp cells. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 37, 726–734.

- Yi, G., Qian, J., Wang, Z., Qi, Y. 2003. A phage-displayed peptide can inhibit infection by white spot syndrome virus of shrimp. *J. Gen. Virol.* 84, 2545-2553.
- Yuan, L., Zhang, X.H., Xiao, N., Dai, L.F., Chen, W.Z., Jia, C.S., Zhao, R.H., Hemmingsen, S.M., Dai, H.P. 2006. Identification of a WSSV neutralizing *scFv* antibody by phage display technology and in vitro screening. *Diseases of aquatic organisms* 72(2): 93-99
- Zhu, F., Du, H.H., Miao, Z.G. 2009. Protection of *Procambarus clarkii* against white spot syndrome virus using inactivated WSSV. *Fish & Shellfish immunology* 26 (5): 685-690