



# **EFFECTO DEL ANTITUMORAL VERTEPORFINA SOBRE LA RESPUESTA INMUNE MEDIADA POR INTERFERÓN EN CÉLULAS DE PEZ**



**Ainhoa Gómez Quintanilla**

**Tutor: Luis Pérez García-Estañ**

**Co-tutor: Miguel Saceda Sánchez**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**Curso 2021-2022**

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>2</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1.- CÁNCER, QUIMIORRESISTENCIA Y RESPUESTA IMMUNE</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2.- LA VERTEPORFINA</b> .....	<b>5</b>
2.2.1. <i>VTPF como antitumoral</i> .....	5
2.2.2. <i>Relación de VTPF con las vías de respuesta inmune</i> .....	6
<b>2.3. LAS INFECCIONES VIRALES EN PEZ (COMO MODELO DE ESTUDIO DE RESPUESTA INMUNE CELULAR)</b> .....	<b>7</b>
2.3.1. <i>Generalidades</i> .....	7
2.3.2. <i>Respuesta mediada por interferón a virus de pez</i> .....	9
2.3.3. <i>Viremia Primaveral de la carpa (SVCV)</i> .....	10
<b>2.4. EL PAPEL DE LAS PROTEÍNAS IFITMs EN RESPUESTA ANTIVIRAL</b> .....	<b>12</b>
<b>2.5. ANTECEDENTES</b> .....	<b>14</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
<b>4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>15</b>
<b>4.1 CULTIVOS CELULARES</b> .....	<b>15</b>
4.1.1. <i>Medios de cultivo</i> .....	15
4.1.2. <i>Líneas celulares</i> .....	15
4.2.1. <i>SVCV</i> .....	16
4.2.2. <i>IPNV</i> .....	16
<b>4.3 COMPUESTOS</b> .....	<b>16</b>
4.3.1. <i>Verteporfina</i> .....	16
<b>4.4 ENSAYO DE SUPERVIVENCIA CELULAR</b> .....	<b>17</b>
<b>4.5 ENSAYO DE FORMACIÓN DE CALVAS</b> .....	<b>17</b>
<b>4.6 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIVIRAL DE VTPF</b> .....	<b>17</b>
<b>4.7 ENSAYO DE PCR CUANTITATIVA</b> .....	<b>18</b>
<b>TABLA 1. LISTA DE PRIMERS</b> .....	<b>19</b>
<b>4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	<b>19</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>19</b>
5.1. <i>TOXICIDAD DE VTPF EN CÉLULAS EPC</i> .....	19
<b>5.2. EFECTO DE LA VTPF EN LA INFECCIÓN VIRAL DE SVCV</b> .....	<b>20</b>
5.2.1 <i>Ensayo de supervivencia celular</i> .....	20
5.2.2 <i>Efecto sobre ensayo de formación de calvas</i> .....	21
5.2.3 <i>Inhibición de la síntesis de RNA de SVCV</i> .....	24
<b>5.3 EFECTO DE LA VTPF SOBRE INFECTIVIDAD DEL VIRUS DE LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA (IPNV)</b> .....	<b>27</b>
5.3.1 <i>Ensayo de formación de calvas</i> .....	27
5.3.2 <i>Inhibición de la síntesis de RNA de IPNV</i> .....	28
<b>5.4 EFECTO DE VTPF SOBRE ACCIÓN ANTIVIRAL DE POLY I:C</b> .....	<b>29</b>
<b>5.5. EFECTO DE LA VTPF SOBRE GENES INDUCIDOS POR INTERFERÓN (IFITM)</b> .....	<b>30</b>
5.5.1 <i>Predicción modelo estructural 3D de IFITM1 e IFITM3/5 de pez cebra</i> .....	30
5.5.2 <i>Expresión relativa de genes ifitm en respuesta a VTPF</i> .....	31
5.5.3. <i>Expresión relativa genes relacionados con respuesta inmune innata</i> .....	32
<b>6.- DISCUSIÓN</b> .....	<b>35</b>
<b>6.1 RELACIÓN ENTRE CÁNCER, QUIMIORRESISTENCIA Y RESPUESTA INMUNE INNATA</b> .....	<b>35</b>
<b>6.2 MODELO VTPF-SVCV-EPC</b> .....	<b>35</b>
<b>6.3 EFECTO DE VTPF SOBRE LA INFECTIVIDAD DE SVCV</b> .....	<b>37</b>
<b>6.4 EL PAPEL DE LAS PROTEÍNAS TRANSMEMBRANA INDUCIDAS POR INTERFERÓN (IFITM)</b> .....	<b>39</b>
<b>7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>40</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>42</b>

## 1. RESUMEN

Existen evidencias de una interconexión entre el desarrollo del cáncer y el sistema inmunológico. Hemos investigado en este trabajo esta posible conexión usando el modelo VTPF-SVCV-EPC. El antitumoral VTPF es un inhibidor de la vía Hippo-YAP, una ruta que se encuentra sobreexpresada en muchos tipos de cáncer de la que se ha sugerido que tenga un papel en la inhibición del virus SARS-CoV2. Por tanto, hemos decidido usar este antitumoral con la finalidad de evaluar su efecto sobre la infección con el virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV) en la línea celular de pez (EPC).

Nuestros resultados muestran la inhibición de la replicación viral por VTPF en los ensayos de qPCR (pero no de formación de calvas) y la estimulación por VTPF de la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune innata.

Además, para profundizar más en el papel de VTPF sobre la vía del interferón hemos usado un estimulador de dicha vía como es el poly I:C, viendo cómo VTPF actúa sobre su acción antiviral, en concreto en lo que se refiere a la expresión de genes relacionados con esta vía como son las proteínas transmembrana inducidas por interferón (IFITM).

Palabras clave: antitumoral, SVCV, virus de pez, respuesta inmune, IFITM

## ABSTRACT

There is evidence for an interplay between cancer development and the immune system. We have investigated in this work this possible connection using the VTPF-SVCV-EPC model. The antitumor VTPF is an inhibitor of the Hippo-YAP, a pathway that is overexpressed in many types of cancer and has been suggested to play a role in the inhibition of SARS-CoV2 virus. Therefore, we have decided to use this antitumor in order to evaluate its effect on infection with spring viraemia of carp virus (SVCV) in the fish cell line (EPC).

Our results show the inhibition of viral replication by VTPF in qPCR assays (but not baldness formation) and the stimulation by VTPF of the expression of genes related to the innate immune response.

In addition, to further investigate the role of VTPF on the interferon pathway, we have used a stimulator of this pathway such as poly I:C, to see how VTPF acts on its antiviral action, specifically with regard to the expression of genes related to this pathway such as interferon-induced transmembrane proteins (IFITM).

Keywords: anti-cancer drug, SVCV, fish virus, immune response, IFITM

## 2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

### 2.1.- Cáncer, quimiorresistencia y respuesta inmune.

El cáncer es una de las primeras causas de mortalidad a nivel mundial. Casi 10 millones de personas fallecieron en el año 2020, siendo el principal el cáncer de pulmón (18%) seguido por el cáncer colorrectal (9,4%) y el cáncer hepático (8,3%) (Sung et al., 2021). A pesar de los grandes avances realizados en el tratamiento del cáncer, un problema es la aparición de tumores resistentes a los tratamientos. Las resistencias a fármacos parecen estar asociadas a un estado inmunológico distinto por lo que es necesario el desarrollo de terapias más efectivas y la identificación de nuevos marcadores de pronóstico y/o nuevas dianas terapéuticas.

Desde la perspectiva inmunológica, el desarrollo y la progresión del cáncer dependen de la intercomunicación entre las células inmunitarias y las células tumorales. Las células tumorales son capaces de evadir las respuestas inmunitarias antitumorales a través de distintos mecanismos (*Budhwani et al., 2018*).

Las citoquinas son importantes en la comunicación cruzada entre las células tumorales y las células inmunitarias. Los interferones (IFN) que se descubrieron como respuesta

celular a infecciones virales (al virus de la gripe en concreto) (Isaacs *et al.*, 1957) engloban una gran familia de citoquinas que hasta ahora se habían estudiado ampliamente en las infecciones por virus, pero ahora se conocen también, como impulsores clave de la inflamación dentro del microambiente tumoral (Dunn *et al.*, 2006).

Los IFN poseen efectos inmunoestimuladores decisivos en varias células inmunitarias, incluidos los linfocitos T específicos de tumores. A pesar de esto, distintos estudios han demostrado que los IFN pueden producir también mecanismos inmunosupresores en el cáncer. Por ello, descubrir el papel de los IFN y las vías de señalización asociadas en la interacción entre el tumor y su microambiente es necesario para adaptar la intervención terapéutica. (Hervas-Stubbs *et al.*, 2011).

Los IFN tienen un papel importante en muchos procesos biológicos. Entre ellos, la respuesta inmunitaria contra tumores y patógenos, o en la diferenciación celular y la apoptosis (Parker *et al.*, 2016). Existen tres tipos distintos de IFN: el tipo I producido por todas las células nucleadas, el tipo II solo es secretado por linfocitos T y Natural Killer (NK) y el tipo III producido por células nucleadas después de la infección viral pero todavía se investiga su papel debido a su reciente descubrimiento (Kotenko *et al.*, 2003).

Las propiedades inmunoestimuladoras de los IFN tipo I, hacen que estas citoquinas sean esenciales en la inmunovigilancia del cáncer. También tienen efectos de inhibición directa mediante una combinación de detención del ciclo y muerte celulares sobre las células tumorales de distintos orígenes (Zitvogel *et al.*, 2016).

La eficacia de distintas estrategias terapéuticas contra el cáncer, entre ellas, fármacos citotóxicos, la radioterapia, las inmunoterapias dirigidas y los virus oncolíticos, dependen de la señalización de IFN tipo I (Zitvogel *et al.*, 2016). Los errores de la vía IFN en las células inmunitarias o en el microambiente tumoral pueden ser los causantes de la resistencia terapéutica en pacientes con cáncer (Snell *et al.*, 2017).

## 2.2.- La verteporfina

### 2.2.1. VTPF como antitumoral.

La verteporfina (VTPF) es un derivado de la benzoporfirina, perteneciente a la familia de las porfirinas, extraída de la planta artemisa (*Tanacetum parthenium*). Fue aprobada en el 2000 por la Food and Drug Administration para su utilización como fotosensibilizador de segunda generación en terapia fotodinámica para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (Wang *et al.*, 2016).

Se ha investigado el papel de la Verteporfina para el tratamiento de distintos cánceres, como el cáncer de mama, cáncer de próstata y el adenocarcinoma ductal pancreático (Pellosis *et al.*, 2017). En la terapia del cáncer la VTPF al principio se usaba como fotosensibilizador, debido a su capacidad de eliminar las células tumorales a causa de la producción de radicales de oxígeno por activación de luz no térmica, luz roja a una longitud de onda de 689 nm (Gavini *et al.*, 2019).

La VTPF tiene efectos que no requieren fotoactivación: provoca la inhibición de la autofagia (proceso de degradación no específico por el que las células entregan sustratos citoplasmáticos a los lisosomas para su degradación) debido a la supresión de la formación de autofagosomas en una etapa temprana (Gu *et al.*, 2021).

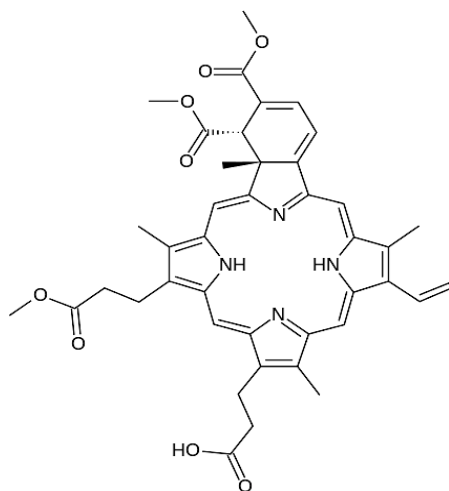


Figura 1. Estructura química de la VTPF

### 2.2.2. Relación de VTPF con las vías de respuesta inmune.

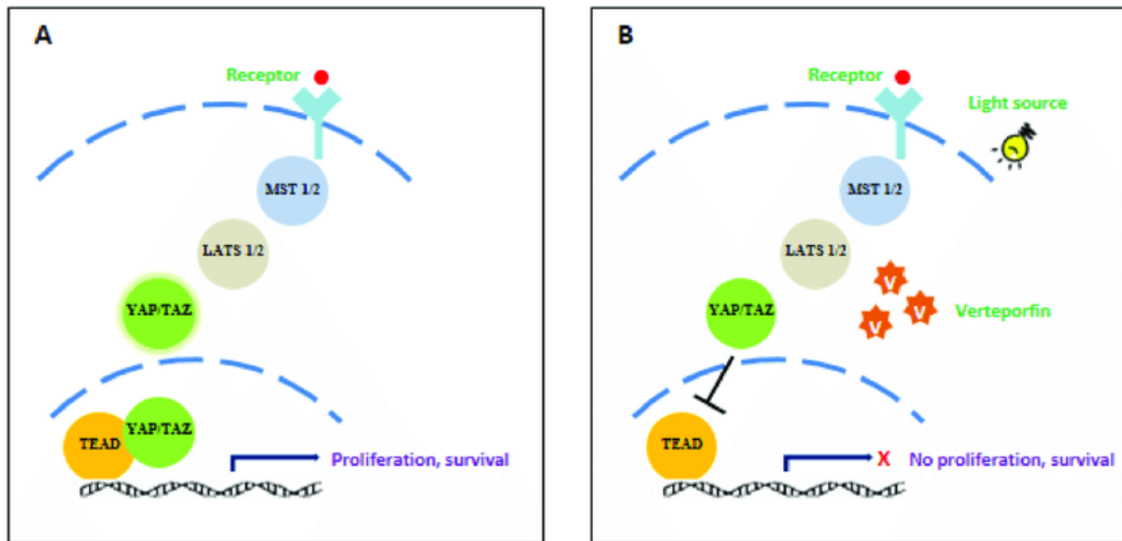
En los últimos diez años se han encontrado evidencias de la acción de VTPF sobre rutas de señalización relacionadas con la respuesta inmune innata. En concreto, se ha identificado a la Verteporfina como un inhibidor de la actividad de YAP. La proteína asociada a Yes (YAP) es un factor protumorigénico que se expresa de forma anómala en varios tipos de cáncer y es un efector central de la vía de señalización Hippo que se encarga de regular el tamaño de los órganos y la tumorigénesis (Feng et al., 2016). La proteína YAP se encuentra sobreexpresada en muchos tipos de cánceres y su nivel de expresión se asocia con los resultados del paciente. Es por esta razón, que la inhibición de la función YAP podría proporcionar un enfoque terapéutico novedoso. No obstante, queda por descubrir el mecanismo por el cual la Verteporfina inhibe la actividad de YAP (Wang et al., 2016).

La vía Hippo-YAP debido a sus funciones biológicas en la homeostasis, el desarrollo y el cáncer de los tejidos despierta interés en la investigación. Esta vía transmite señales extracelulares e intracelulares variadas, incluyendo: densidad celular, polaridad celular, señales mecánicas, ligandos de receptores acoplados a proteína G y dirigiendo la proliferación celular, supervivencia, apoptosis y diferenciación (Yu et al., 2015). Por lo que, una desregulación de la vía Hippo tiene implicaciones importantes en la tumorigénesis, la progresión y la metástasis y probablemente, es el principal mecanismo de resistencia a diversas terapias dirigidas y quimioterapias (Avruch et al., 2012).

La regulación conjunta entre la vía Hippo-YAP y la inmunidad innata ha sido comprobada por un gran número de estudios. Varios de ellos apuntan a que muchos síntomas de inmunodeficiencia, incluyendo las infecciones bacterianas y virales periódicas, están asociados con la deficiencia de la señalización de Hippo, lo que implica su papel crucial en la modulación inmunitaria (Harvey et al., 2013).

Se han identificado múltiples proteínas que participan en la interrelación entre la vía Hippo-YAP y la inmunidad innata. En la mayoría de los casos, la señalización Hippo-YAP potenció la respuesta antiviral innata, pudiendo también retroalimentar positivamente la vía Hippo-YAP a través de múltiples mecanismos (Wang et al., 2020).

Por tanto, la inmunidad innata seguramente influye en la tumorigénesis y la progresión de los tumores a través de su interacción con la señalización Hippo.



**Figura 2.** Efecto de la VTPF sobre vía Hippo-YAP. A) En condiciones normales, las señales de crecimiento activan la vía de señalización Hippo, provocando la activación del complejo YAP/TAZ. Este complejo se transloca al núcleo para formar YAP/TEAD, que activa varios factores de crecimiento, lo que conduce al crecimiento y la proliferación celular. B) La verteporfina bloquea la translocación de YAP/TAZ al núcleo, inhibiendo así el crecimiento y la supervivencia de las células. Imagen tomada de (Gheewala *et al.*, 2017)

### 2.3. Las infecciones virales en pez (como modelo de estudio de respuesta inmune innata).

#### 2.3.1. Generalidades

Los peces, como otros vertebrados, son susceptibles a infecciones víricas, algunas de las cuales causan enormes pérdidas a la acuicultura. Los virus de pez son inocuos para el ser humano, y por ello son una herramienta para investigación, libre de riesgo.

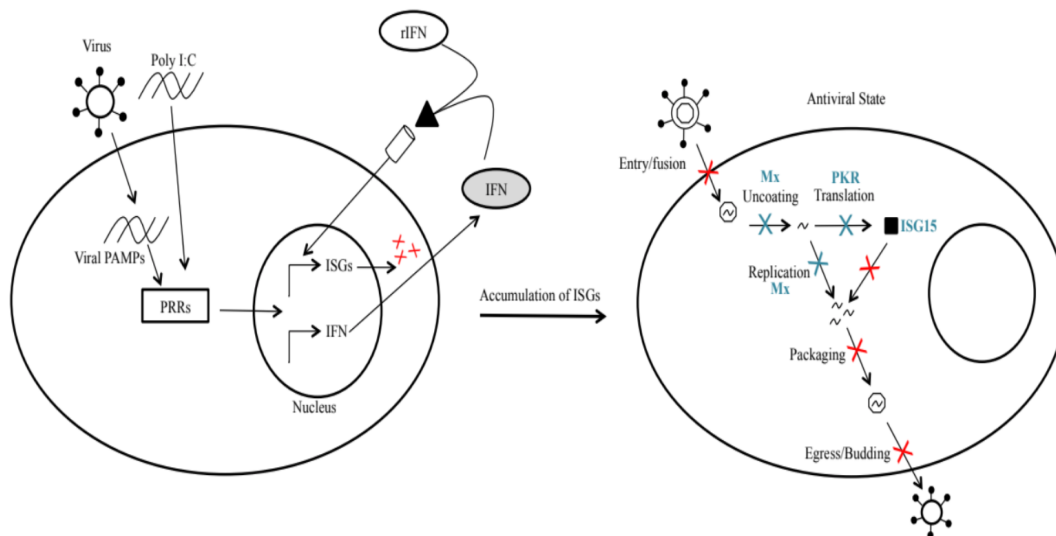
Los peces son capaces de generar respuestas inmunitarias fuertes y protectoras frente a muchos virus (Verrier *et al.*, 2011). Las infecciones por patógenos son reconocidas por el sistema inmune que actúa mediante dos tipos de respuesta: innata y adaptativa. El sistema inmune innato es la primera línea de defensa del organismo frente a agentes infecciosos, potencialmente perjudiciales. Su acción y respuesta, prepara al organismo para la posterior y específica actuación del sistema inmune adaptativo. (Jinushi, 2012)



La respuesta inmunitaria innata del huésped se desencadena mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) por parte de los receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) (Verrier et al., 2011). Después, se induce la activación de una cascada de genes que acaba en la producción de citoquinas que actúan en las células infectadas y sus vecinas, evitando que se extienda la infección (McNab et al., 2015).

Una de estas sustancias producidas son los interferones, citoquinas inducibles por el virus que comparten propiedades antivirales. Los IFN se clasifican en tres familias (como hemos mencionado con anterioridad) en función de los receptores afines con los que interactúan y de las respuestas inmunitarias que inician. Los IFN de tipo I y III desencadenan vías de señalización que conducen a la activación de las defensas inmunitarias innatas contra la infección viral. Mientras que los IFN de tipo II promueven principalmente la inmunidad mediada por células (Verrier et al., 2011).

La señalización de IFN da como resultado a través de la ruta JAK-STAT la activación de la expresión de genes estimulados por interferón (ISG). Estos ISG codifican proteínas específicas con distintas funciones antivirales, como la inhibición de la entrada viral, la transcripción de genes virales, la síntesis de proteínas virales y el ensamblaje y liberación de partículas virales (Bailey, et al., 2014).



**Figura 3.** Inducción y función de los genes estimulados por IFN. Imagen tomada de (Poynter et al 2016).

Se han descrito en los mamíferos más de 200 genes que responden al interferón (ISG) mostrando la gran diversidad de las vías celulares desencadenadas por las infecciones víricas. Además, se ha visto la presencia de los genes IFN en especies de teleósteos: pez cebra (*Danio rerio*), carpa común (*Cyprinus carpio*), la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*), la carpa roja (*C. auratus red var.*), y la carpa negra (*Mylopharyngodon piceus*) (Gan et al., 2019; Zou et al., 2011).

### 2.3.2. Respuesta mediada por interferón a virus de pez

Hay un buen número de virus, pertenecientes a varias familias, que causan enfermedades en peces. Dentro de la familia *Nodaviridae* destaca el virus de la necrosis nerviosa viral (NNV), una enfermedad grave de varias especies de peces marinos, caracterizada por importantes pérdidas asociadas a lesiones de vacuolación del sistema nervioso central y de la retina (OIE, 2019). En esta familia, se ha observado una fuerte respuesta de la vía del interferón: en la lubina una fuerte amplificación en la expresión de las proteínas antivirales IFN y Mx tras la infección (Scapigliati et al., 2010), en la dorada una fuerte regulación al alza de la proteína Mx en el cerebro con respecto a la observada en la lubina. Estas observaciones apoyan la teoría de que el cerebro de los peces, al igual que en los humanos, incluso sin ser un órgano inmunitario, es capaz de desencadenar una fuerte respuesta inflamatoria caracterizada por la expresión de citoquinas inflamatorias y moléculas antivirales (Dios et al., 2007).

En cuanto a la familia *Birnaviridae* destaca el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) que causa enfermedades en especies de peces marinos de cultivo, como el rodaballo y el bacalao (OIE, 2019). Cuando se produce la señalización del IFN a causa de la infección provoca interacciones complejas entre el virus y el huésped dependiendo, además, del tipo de célula infectada. In vivo IPNV induce una actividad similar a la del IFN provocando la expresión de moléculas inducidas por interferón: Mx e ISG15 tanto en el salmón del atlántico como en el bacalao (McBeath et al., 2007). Sin embargo, in vitro, IPNV suprime la expresión de Mx en células de trucha arco iris al contrario que en los macrófagos del salmón. Además, se conoce que IPNV es sensible a la acción antiviral

de los IFN y de los genes relacionados con el interferón (Mx, IPS-1) debido al desarrollo de mecanismos para superar las respuestas del IFN (Collet et al., 2007).

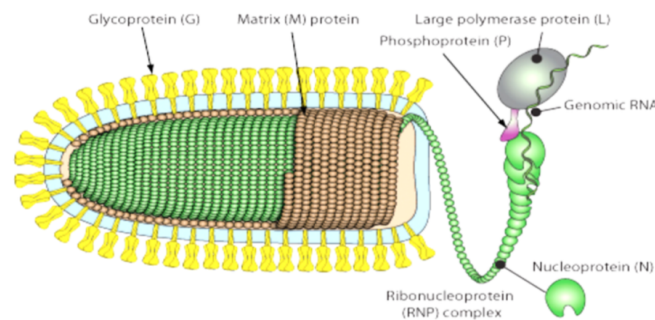
En la familia *Isaviridae* destaca el virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV) que supone una amenaza considerable para la acuicultura del salmón del Atlántico (OIE, 2019). En cultivos celulares se ha visto que ISAV es un inductor potente y temprano del interferón y de genes inducidos por interferón (Mx e ISG15) mientras que en infecciones en pez se produce un aumento de la expresión de Mx después de la infección con ISAV, por tanto, Mx puede estar implicada en la patogénesis de la infección por ISAV (Jensen et al., 2002).

Por último, en la familia *Rhabdoviridae* destacan: el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV), el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) y el virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV) siendo importantes patógenos de peces tanto salvajes como de cultivo en toda América del Norte, Asia y Europa (OIE, 2019). Muchos estudios han demostrado que la familia *Rhabdoviridae* induce una fuerte respuesta inmune innata caracterizada por la regulación de genes inflamatorios y relacionados con el interferón. La glicoproteína de superficie G del rhabdovirus de los peces ha sido identificada como un potente inductor de las respuestas antivirales mediadas por el interferón de tipo I (IFN) y se ha utilizado como base para vacunas de ADN eficaces contra las infecciones por rhabdovirus (Verjan et al., 2008). En este sentido, la vacunación con ADN puede ser una buena herramienta para estudiar las respuestas inmunitarias protectoras contra estas infecciones (Lorenzen et al., 2002). Además, se ha visto en estos virus mencionados que el sistema de Interferón (IFN) tipo 1 puede ser importante debido al número de genes relacionados con el IFN que se regulan: entre ellos, el gen estimulado por interferón 15kDa (ISG15), el gen estimulado por interferón 56kDa (ISG56) y la proteína Mx (Byon et al., 2006).

### 2.3.3. Viremia Primaveral de la carpa (SVCV)

Una enfermedad, importante en el sector de la acuicultura es la causada por el virus Viremia primaveral de la Carpa (SVCV) perteneciente a la familia *Rhabdoviridae* como

hemos mencionado con anterioridad. La familia *Rhabdoviridae*, incluye alguno de los patógenos virales de mayor importancia en acuicultura (Leong et al., 2008). Se trata de una familia que tiene un genoma de ARN monocatenario de polaridad negativa. La partícula viral tiene forma de bala y un genoma con simetría helicoidal que codifica 6 proteínas: 3'-Proteína de la nucleocápside (N)-fosfoproteína (P)-Proteína de la matriz (M)- Glicoproteína (G)-proteína no estructural (NV)- ARN polimerasa dependiente de ARN (L) -5' (Figura 2).



**Figura 4.** Estructura del virión de la familia *Rhabdoviridae*. Imagen tomada de viralzone. <https://viralzone.expasy.org>

La viremia primaveral de la carpa pertenece al género *Sprivivirus* por lo que no tiene la proteína NV (Ashraf et al., 2016). Además, aparece en la lista de Enfermedades más importantes de peces confeccionada por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2019).

Las variedades de carpa común son los principales hospedadores del SVCV y más susceptibles a la infección. La enfermedad se ha registrado en la mayoría de los países europeos y en algunos países del este de Europa que experimentan bajas temperaturas del agua durante el invierno. Los peces pueden ser portadores de SVCV con o sin síntomas. Los signos clínicos son inespecíficos en el caso de la carpa, los síntomas más comunes incluyen distensión abdominal, exoftalmia, inflamación o edema del conducto de ventilación y hemorragias petequiales de la piel, las branquias y los ojos. La tasa de mortalidad es más alta en los peces jóvenes, informándose tasas de mortalidad de hasta el 70% en carpas jóvenes durante los brotes y en peces infectados experimentalmente, la tasa de mortalidad puede llegar al 90% (OIE, 2019).



**Figura 5.** Capas comunes (*Cyprinus carpio*) enfermas con SVCV. Imágenes tomadas Revista MVZ Córdoba, vol.25 Núm.3 (2020).

Además, de la importancia del SVCV en el sector de la acuicultura y su buen crecimiento en las células de la carpa donde se ha identificado los genes relacionados con IFN, le convierte en el candidato adecuado para el estudio llevado a cabo en este trabajo.

#### **2.4. El papel de las proteínas IFITM en respuesta antiviral.**

Las proteínas transmembrana inducidas por interferón, conocidas como IFITM, son una familia de proteínas pequeñas homólogas, localizadas en las membranas endosomales y plasmáticas que participan en la respuesta celular a muchos virus (Zhao et al., 2018). Las IFITM contribuyen en distintos procesos biológicos, como la respuesta inmunitaria, el alojamiento y la maduración de células germinales, la mineralización ósea, restricción viral, control del ciclo celular y apoptosis (Yáñez *et al.*, 2020).

Las IFITM están formadas por cinco dominios: dominio N-terminal (NTD), dominio intramembrana (IMD), un bucle intracelular conservado (CIL), dominio transmembrana (TMD) y dominio C-terminal (CTD) (Chen et al., 2017).

Los miembros de la familia de proteínas transmembrana inducidas por interferón (IFITM) se encuentran entre los genes estimulados por interferón (ISG) más estudiados, mostrando una potente actividad antiviral para una amplia gama de virus envueltos. (Bailey et al., 2017). Se han identificado cinco genes Ifitm (ifitm1, ifitm2, ifitm3, ifitm5 e ifitm10) en humanos, que están ubicados en el cromosoma 11 (Liao et al., 2019). Se ha demostrado que solo tres de ellos (ifitm1, ifitm2 e ifitm3) funcionan como factores de restricción contra diferentes virus (Zhang et al., 2021) debido a que se encuentran inducidos por interferón (IFN I y II) y donde tiene un papel relevante la localización de estas proteínas.

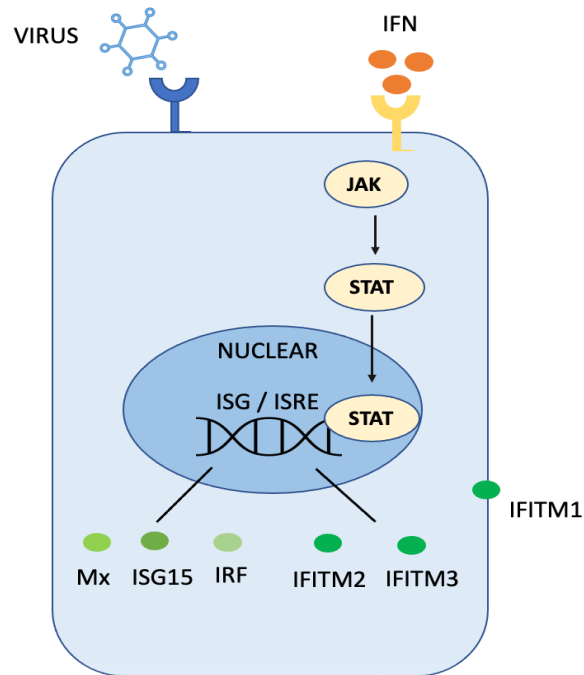
IFITM1 se encuentra en la superficie celular, por lo que se propone que desempeñe un papel importante en la restricción de virus que ingresan por fusión directa con la membrana plasmática, aunque el mecanismo exacto de acción antiviral no ha sido definido todavía (Smith *et al.*, 2019). IFITM2 e IFITM3 se expresan dentro del compartimiento endocítico celular. Ambas proteínas muestran un alto grado de similitud, lo que sugiere que podría haber cierta redundancia en la acción antiviral (Desai *et al.*, 2014).

Las IFITM suprimen la infección de los virus por medio de tres estrategias: 1) restricción de la entrada del virus en la célula diana. 2) Incorporación de IFITM en viriones durante el ensamblaje viral dando lugar a una reducción de la infectividad de la partícula viral. 3) Inhibición de la síntesis de proteínas virales (Liao et al., 2019).

Además, se sabe que las IFITM restringen la entrada de los virus de ARN por la inhibición de la fusión con la membrana plasmática y las membranas endosómicas o lisosomales (Li *et al.*, 2018). Hace poco se ha evidenciado que también pueden restringir algunos virus de ADN, pero es posible, que las proteínas IFITM no afecten a la patogénesis de la mayoría de los virus de ADN (Munoz-Moreno *et al.*, 2016).

La actividad antiviral de las IFITM depende de varios factores, particularmente, del tipo de virus y de cuál sea su mecanismo de entrada a la célula. Todavía, se requieren más

trabajos de investigación para definir las propiedades antivirales de los IFITM y cómo los virus escapan de la restricción de IFITM (Anafu *et al.*, 2013).



**Figura 6.** Ruta de inducción de genes estimulados por interferón Imagen modificada de (Shi *et al.*, 2019).

## 2.5. Antecedentes

Este trabajo se basa en investigaciones previas de nuestro laboratorio que se remontan a las investigaciones sobre el efecto de los antitumorales 5-FU, VTPF y carmustina sobre la infección en células de la carpa (EPC) con el virus VHSV (Gumiel, 2020).

Posteriormente se estudió el efecto de los antitumorales 5-FU y VTPF sobre respuesta inmune innata en células de pez cebra (ZF4) infectadas con SVCV (Talavera, 2021). Se obtuvieron las primeras evidencias de que VTPF podía producir una inhibición de la replicación de SVCV, aunque su efecto sobre la expresión de los genes ifitm no era claro.

En el laboratorio de Oncología Molecular del Dr. Miguel Saceda (IDiBE-FISABIO) se vio la aparición de algunos genes respuesta innata como las ifitm, como diferencialmente expresados en células derivadas de tumores quimiorresistentes.

### 3. OBJETIVOS.

El planteamiento global de esta investigación fue estudiar el papel de la Verteporfina, un compuesto utilizado en el tratamiento del cáncer y de enfermedades degenerativas, sobre la respuesta inmune en células EPC de pez. Los objetivos marcados para esta investigación fueron los siguientes:

- Determinar el efecto de la VTPF sobre la replicación del virus de pez SVCV.
- Determinar cómo actúa la VTPF en células en las que se estimula la respuesta de interferón.
- Evaluar el impacto de la VTPF sobre la expresión de los genes (ifitm1, ifitm5, irf3, isg15) relacionados con la vía del interferón.

### 4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

#### 4.1 Cultivos celulares

##### 4.1.1. Medios de cultivo

Para el crecimiento y mantenimiento de las células EPC, el medio de cultivo usado fue RPMI- 1640 Dutch con 20mM HEPES (290 mOsm/Kg) (Gibco BRL-Invitrogen, Barcelona, España), 2% o 10% de suero fetal bovino (SFB, Linus-Cultek, Madrid), 2mM de glutamina (Gibco BRL), 1mM de piruvato sódico (Gibco BRL), y antibióticos (1,2 µg/ml de anfotericina B y 50 µg/ml de gentamicina) (Gibco BRL) (Estepa, A. *et al.*, 1992). En este trabajo dependiendo del porcentaje de suero fetal bovino en disolución, se nombra RPMI 2% o 10%.

##### 4.1.2. Líneas celulares

La línea celular EPC (Epitelioma Papullosum Cyprini) son células epiteliales cuyo origen es una especie de carpa *Pimephales promelas*, perteneciente a la familia *Cyprinidae*. Esta línea celular se adquirió de la Colección Europea de Cultivos Celulares, cuyo número de identificación (no 93120820), ECACC. Para el mantenimiento de dicha línea celular se



usaron botes de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (~ 7,5 millones de células) en medio RPMI-10%, bajo unas condiciones de temperatura 28°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>.

Para subcultivar la línea celular EPC, se usó una solución de Tryple Select (Gibco) con la finalidad de despegar las células de los frascos y con el medio de cultivo al volumen necesario se realizaron las diluciones correspondientes para finalmente sembrar los nuevos frascos o placas (24 o 96 pocillos) manteniéndose a 21°C.

## **4.2 Virus e infecciones**

### **4.2 .1. SVCV**

El virus de la viremia primaveral de la carpa pertenece a la familia *Rhabdoviridae*, en concreto, al género *Sprivirus*. En este trabajo se usó la cepa 56/70 de SVCV aislada de carpa. Las infecciones que se realizaron con SVCV fueron mantenidas a 21°C en medio RPMI 2%.

### **4.2 .2. IPNV**

El virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa pertenece a la familia *Birnaviridae*, en concreto, al género *Aquabirnaviridae*. En este trabajo se usó la cepa Sp de IPNV aislada de la trucha. Las infecciones que se realizaron con IPNV fueron mantenidas a 21°C en medio RPMI 2%.

## **4.3 Compuestos**

### **4.3 .1. Verteporfina**

El antitumoral Verteporfina (VTPF) fue proporcionado por el Servicio de Farmacia del Hospital General Universitario de Elche.

La solución stock de Verteporfina (VTPF) se preparó haciendo diluciones de trabajo de 10 µM y 100 µM en PBS estéril.

#### **4.4 Ensayo de supervivencia celular**

Las células EPC sembradas en placas de 96 pocillos con medio RPMI 10%, tras alcanzar una confluencia del 100%, fueron expuestas a concentraciones crecientes del antitumoral Verteporfina, diluido en medio RPMI 2% o en SVCV 0,02 virus/célula para evaluar su toxicidad o el grado de protección frente a la infección viral con SVCV. Transcurridas 48 o 72 hpi se procedió a teñir la placa con Giemsa (5mg/mL) o cristal violeta (1% peso/volumen), según el grado de toxicidad del compuesto. Finalmente, para determinar la supervivencia celular se midió la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro Eon Biotek (BioTek Instruments, Inc., VT, USA).

#### **4.5 Ensayo de formación de calvas**

Las células EPC sembradas en placas de 24 pocillos con medio RPMI 10%, tras alcanzar una confluencia del 100%, fueron expuestas a tratamiento poly I:C (20 µg/mL) durante 2h y Verteporfina (0,5 µM) durante 24h o poly I:C (20 µg/mL) y Verteporfina (0,5 µM) durante 24h. Transcurrido el tiempo se infectó la placa con el virus SVCV (30 virus/pocillo) o IPNV (150 virus/pocillo) dejándolo actuar durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se retira el medio y se añade 600 µl/pocillo de metilcelulosa (8 mg/mL en medio RPMI-2% a pH 7) o VTPF más metilcelulosa (0 h). Debido a que es un medio semisólido que dificulta la extensión del virus por toda la placa limitando la infección a células adyacentes. Las células bajo metilcelulosa se dejan incubar durante 3-4 días para la formación de calvas, pasado este tiempo se tiñe la placa con cristal violeta y se deja incubar durante 1 hora. Finalmente se procede a la captura de imagen.

#### **4.6 Evaluación del efecto antiviral de VTPF**

Las células EPC sembradas en placas de 24 pocillos con medio RPMI 10%, tras alcanzar una confluencia del 100%, fueron expuestas a los distintos tratamientos: poly I:C (2h o 24h), VTPF (-24h o 0h) o VTPF + poly I:C según el experimento y se procedió a la infección

o no con SVCV o IPNV (0,02 virus/célula). Finalmente se determinó la actividad antiviral transcurridos 1 o 3 dpi mediante PCR cuantitativa.

#### 4.7 Ensayo de PCR cuantitativa

Las muestras de las células se recogen en 350  $\mu$ l de buffer de lisis TRK. Seguidamente, se realiza la extracción de RNA utilizando el kit E.Z.N.A *Total RNA* de *Omega Biotek*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, se cuantifica la cantidad de RNA extraído mediante un espectrofotómetro *Nanodrop*.

Seguidamente, se procedió a realizar la transcripción inversa (RT), los componentes de la reacción consistieron en 300ng de RNA total. Por cada 11.5 $\mu$ L de RNA se empleó 1 $\mu$ L de una mezcla de dNTPs a concentración 10mM y 0.5 $\mu$ L de cebadores *random hexamers*, obteniendo una mezcla de 13 $\mu$ L. La desnaturalización de RNA se llevó a cabo a 65 $^{\circ}$ C durante 5 minutos, tras la cual las muestras se dejaron reposar en hielo durante aproximadamente un minuto. Después, a cada muestra se le añadieron 4 $\mu$ L de *First Strand Buffer RT 5X*, 2 $\mu$ L de DTT, 0.5 $\mu$ L de *HP-RNaseInhibitor*, 0.5 $\mu$ L de MMLV-RT obteniendo 7 $\mu$ L de volumen por tubo. La reacción se llevó a cabo en un termociclador *Applied Biosystems 2700* siguiendo el siguiente programa: 25 $^{\circ}$ C x 10min, 37 $^{\circ}$  x 50min, 70 $^{\circ}$  x 15min.

Por último, la qPCR se realizó en un volumen de 20  $\mu$ L que contenía 2  $\mu$ L de cDNA, 10  $\mu$ L de *SYBR Green Universal PCR Master Mix* de *Applied Biosystems*, así como los primers necesarios para cada gen (Tabla 1) en un termociclador *Applied Biosystems 2700* con el siguiente programa: 50 $^{\circ}$ C durante 2 minutos seguido de una desnaturalización inicial a 95 $^{\circ}$ C durante 10 minutos; 40 ciclos de 95 $^{\circ}$ C durante 15 segundos y 60 $^{\circ}$ C durante 1 minuto. El nivel de expresión de los genes N de SVCV, segmento A de IPNV, ifitm1, ifitm5, irf3, isg15 se normalizaron respecto a eF1 $\alpha$  (Factor de elongación de la traducción 1-alfa), tomado como control endógeno. Los valores de expresión relativa de cada gen se calcularon usando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Los datos fueron representados como la media  $\pm$  desviación estándar (SD), de cada muestra por duplicado.

**Tabla 1.** Lista de primers

Gen	Primer Forward	Primer Reverse
eF1 $\alpha$	CTGGAGGCCAGCTCAAACAT	CATTTCCCTCCTTACGCTCAAC
SVCV-N	GCATTATGCCGCTCCAAGAG	AGCTTGCATTTGAGATCGA
IPNV-A	TCTCCCGGGCAGTTCAAGT	CGGTTTCACGATGGGTTGTT
ifitm1	CTTCTGTAACCCATGCTGC	GTGACAGCAGCGATGATGAG
ifitm5	AGACAAGGCGAAGTGGTACA	TTTGGTGGTGGGATTGCTTG
irf3	GTTTAGAGGGACAATTAAGTGGACTA	GAGGGTCCACTCTTTGAAAATG
isg15	GCCTGGAAGTGAGCACTAAT	ATGGCTACCGTTGTTGATAGAA

#### 4.8 Análisis estadístico

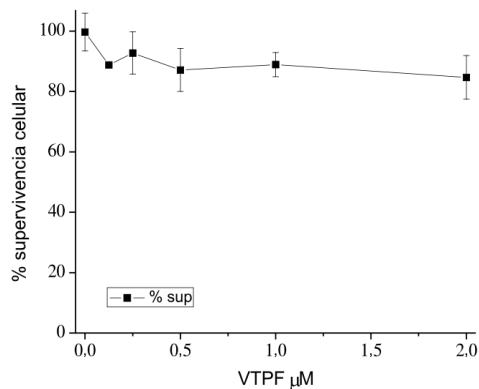
Se utilizó el software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) para el análisis estadístico. Se usó la prueba t de Student de datos independientes para calcular las diferencias de las medias de los distintos grupos experimentales. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando los P valores eran  $< 0.05$ .

## 5. RESULTADOS

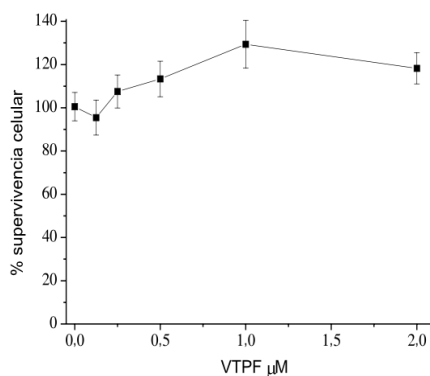
### 5.1. Toxicidad de VTPF en células EPC

En primer lugar, se evaluó la toxicidad del compuesto utilizando la línea celular de carpa EPC. En este ensayo se realizaron dos experimentos a distintos tiempos de tratamiento con el objetivo de observar la dosis-respuesta de la VTPF. Para ello, se sembraron placas de 96 pocillos con células EPC y se añadieron concentraciones crecientes de VTPF: 0,125, 0,25, 0,5, 1 y 2  $\mu\text{M}$  en base a resultados obtenidos anteriormente en la línea celular de pez cebra ZF4. Transcurridas 48 horas y 72 horas de tratamiento se determinó finalmente la supervivencia celular (figura 1).

A)

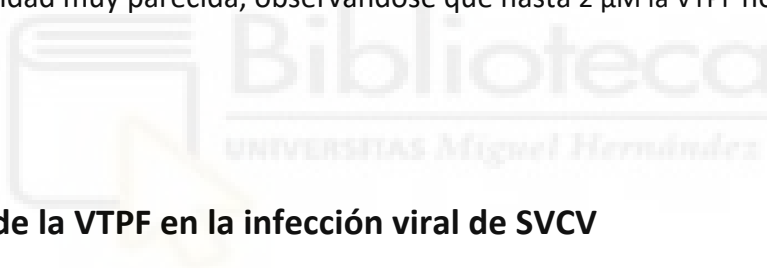


B)



**Figura 7.** Evaluación de la toxicidad de VTPF a las concentraciones crecientes (0,125, 0,25, 0,5, 1 y 2  $\mu\text{M}$ ) sobre las células EPC. **A)** Curva de toxicidad tras una exposición de 48 horas con el compuesto. **B)** Curva de toxicidad tras una exposición de 72 horas con el compuesto. Cada punto representa el promedio del triplicado con su desviación estándar. La media del triplicado del control sin tratamiento se tomó como el 100 %.

Nuestros resultados nos muestran la dosis-respuesta de los tratamientos a las 48 y 72 horas, respectivamente, de la VTPF en las células EPC. Ambas gráficas muestran una curva de toxicidad muy parecida, observándose que hasta 2  $\mu\text{M}$  la VTPF no es tóxica.

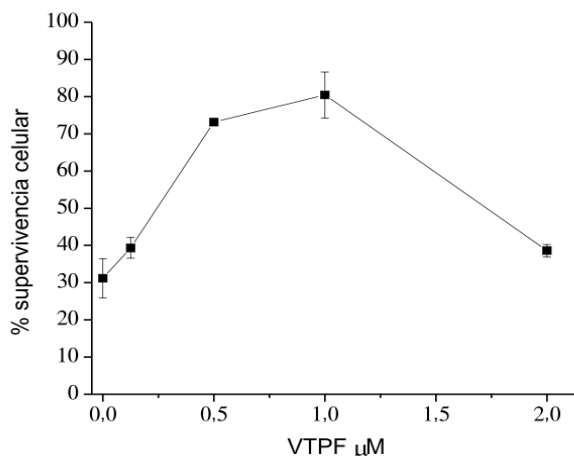


## 5.2. Efecto de la VTPF en la infección viral de SVCV

En los siguientes experimentos para evaluar el posible efecto de la VTPF sobre la infección vírica, decidimos usar el virus SVCV, un virus que replica en las células EPC.

### 5.2.1 Ensayo de supervivencia celular

En el ensayo de supervivencia celular se mide la lisis de las células EPC a causa de la infección con SVCV. Se hizo un tratamiento a las células a concentraciones crecientes con VTPF más el virus SVCV para observar el grado de protección del compuesto frente a la infección. Para ello, se añadieron concentraciones crecientes de VTPF: 0,125, 0,25, 0,5, 1 y 2  $\mu\text{M}$  junto con el virus SVCV (0h). Transcurridas 72 horas, se retiró el medio y se procedió a la tinción con Giemsa. Finalmente, se midió la absorbancia a 570 nm para determinar la supervivencia celular.



**Figura 8.** Evaluación del efecto de la VTPF sobre la infección vírica con SVCV  $\text{moi} = 0,02$  virus/célula en células EPC. Curva de dosis - respuesta de la VTPF con las concentraciones 0,125, 0,5, 1 y 2  $\mu\text{M}$  sobre las células EPC tras una exposición de 72 horas. Las células se tiñeron con Giemsa y se midió absorbancia a 570 nm. Cada punto representa el promedio del triplicado con su desviación estándar, teniendo en cuenta el triplicado del control no infectado sin tratamiento como el 100 %.

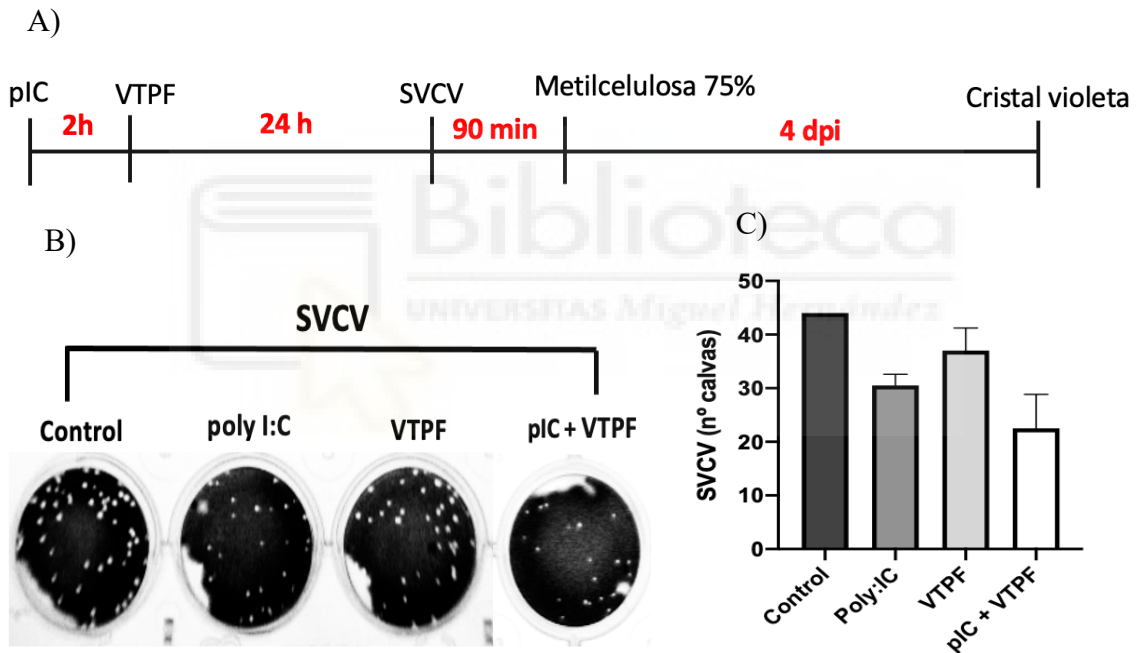
Se puede observar que en las concentraciones de 0,5 y 1  $\mu\text{M}$  de VTPF hay un aumento del 40-50 % de la supervivencia celular comparado con el control infectado sin tratamiento que tiene un 28% de supervivencia (Figura 8). Este ensayo muestra que, en las concentraciones mencionadas del compuesto hay un grado de protección frente a la infección con SVCV. Mientras que a la concentración máxima utilizada de 2  $\mu\text{M}$  de VTPF se aprecia un descenso en la supervivencia. Por tanto, a partir de los resultados obtenidos de la toxicidad y de dicho ensayo decidimos usar en los siguientes experimentos la concentración de 0,5  $\mu\text{M}$  de VTPF para evitar posibles problemas de toxicidad (ya que en la concentración de 2  $\mu\text{M}$  se produjo una disminución de la supervivencia celular) en la [figura 8](#).

### 5.2.2 Efecto sobre ensayo de formación de calvas

Una vez tuvimos establecida la concentración necesaria del compuesto para conseguir un grado de protección contra la infección por SVCV, decidimos realizar un ensayo de formación de calvas. La infección de las células por SVCV en un medio denso es capaz de producir la formación de calvas en la monocapa celular que una vez teñidas las células pueden observarse a simple vista. Esto nos permite determinar el grado de infectividad de SVCV con los distintos tratamientos. En los siguientes experimentos incorporamos la molécula de poly I:C como uno de los controles. El poly I:C es un ARN bicatenario

sintético que activa la ruta del interferón. Por tanto, tras un tratamiento de las células con poly I:C se debería observar una inhibición en la replicación del virus, y por tanto una disminución del número de calvas.

Para poner a punto el experimento sembramos dos placas de 24 pocillos con células EPC y cuando se alcanzó una confluencia del 100% se añadió el control de poly I:C 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a los correspondientes pocillos. En la primera placa, se dejó actuar el poly I:C durante dos horas. Transcurrido ese tiempo se retiró el medio y se añadió medio RPMI 2%. Al mismo tiempo se añadió la VTPF 0,5  $\mu\text{M}$  a los correspondientes pocillos dejándolo actuar durante 24 horas. Finalizado el tiempo se retiró el medio de todos los pocillos y se infectó toda la placa con el virus SVCV.

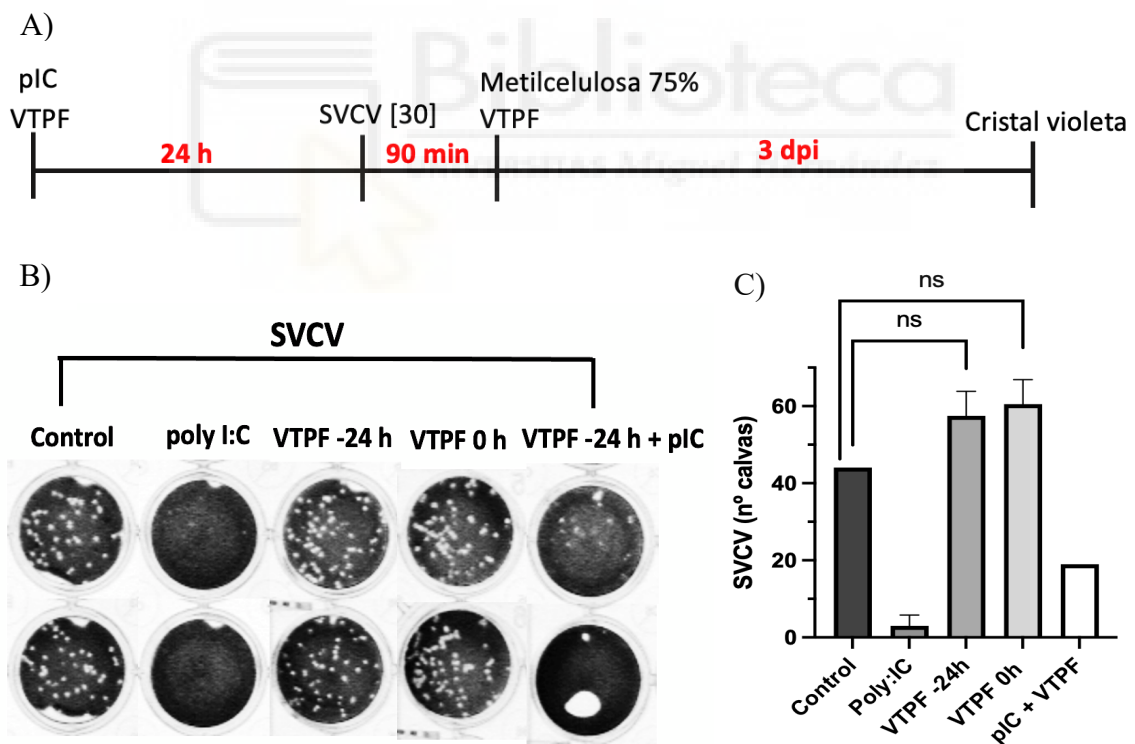


**Figura 9** Evaluación del efecto de la VTPF 0,5  $\mu\text{M}$  (-24 h) y poly I:C 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (2h) sobre la infección con SVCV 30 virus/pocillo mediante ensayo de formación de calvas usando metilcelulosa y tinción con cristalvioleta a los 4 dpi. A) Diseño experimental. B) Imagen representativa de los puntos del experimento. C) Número de calvas por pocillo. Cada barra representa el promedio de un duplicado con su correspondiente error. ns= no significativo.

El resultado obtenido muestra la formación de calvas en todos los pocillos infectados con el virus SVCV (B). Para obtener el resultado de forma numérica y poder sacar conclusiones, procedimos al contaje del número de calvas (figura 9). De esta forma, el mayor número de calvas se encuentra en el control de SVCV, mientras que en el control

de poly I:C hay una inhibición del 15 %. En el caso de VTPF hay también una inhibición pero no es estadísticamente significativa. Lo más destacable es que el menor número de calvas se consigue con el doble tratamiento poly I:C + VTPF (C).

Puesto que con el tratamiento de 2h con poly I:C había disminuido solo un 15% el número de calvas, decidimos prolongar el tiempo de tratamiento del poly I:C, dejándolo actuar durante 24 horas. En cuanto a la VTPF, además del pretratamiento (-24 h), fue añadida para que se mantuviera durante la infección (0 h). Para ello, una vez que las células alcanzaron una confluencia del 100 %, añadimos poly I:C 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y VTPF 0,5  $\mu\text{M}$  a los correspondientes pocillos durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se infectó con el virus SVCV usando la cantidad de 30 virus/pocillo durante 90 minutos. Seguidamente, se retiró el medio y se añadió el compuesto mezclado con la metilcelulosa, dejándolo actuar durante 3 días y se procedió a la tinción con cristal violeta.



**Figura 10.** Evaluación del efecto de la VTPF 0,5  $\mu\text{M}$  (-24 h y 0 h) y poly I:C 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (24h) sobre la infección con SVCV 30 virus/pocillo mediante ensayo de formación de calvas. Se tiñó con cristalvioleta a los 3dpi. A) Diseño experimental. B) Imagen representativa de los puntos del experimento. C) Número de calvas del experimento. Cada barra representa el promedio de un duplicado con su correspondiente desviación estandar. ns= no significativo

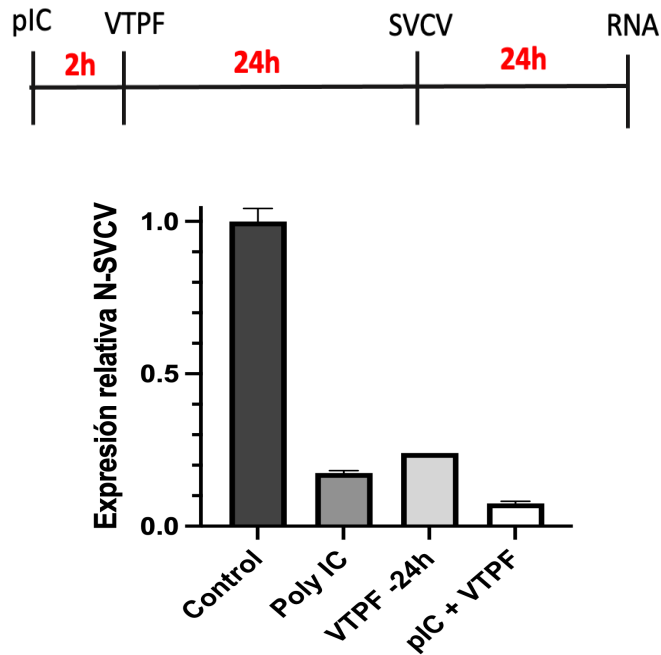


Se observa la formación de calvas en todos los pocillos, menos en los que se trató con poly I:C donde hay muy pocas calvas y de mucho menor tamaño (no apreciable a simple vista) (figura 10.B). Para obtener un resultado cuantitativo se procede al contaje del número de calvas. Podemos observar que el control de poly I:C produce una inhibición del 35% de la replicación de SVCV, lo que quiere decir que como esperábamos, el pretratamiento de poly I:C durante 24 horas sí que es efectivo. En el caso de la VTPF -24 h y 0 h no se observa ninguna inhibición del virus. Por el contrario, hay un aumento en el número de calvas (aunque no significativo) lo que quiere decir que en este ensayo, la VTPF no ha mostrado capacidad para detener la infección con SVCV (figura 10.C).

### 5.2.3 Inhibición de la síntesis de RNA de SVCV

Con el objetivo de confirmar estos resultados decidimos medir la síntesis de RNA de SVCV en presencia de VTPF, determinando la expresión relativa del gen N de SVCV mediante qPCR.

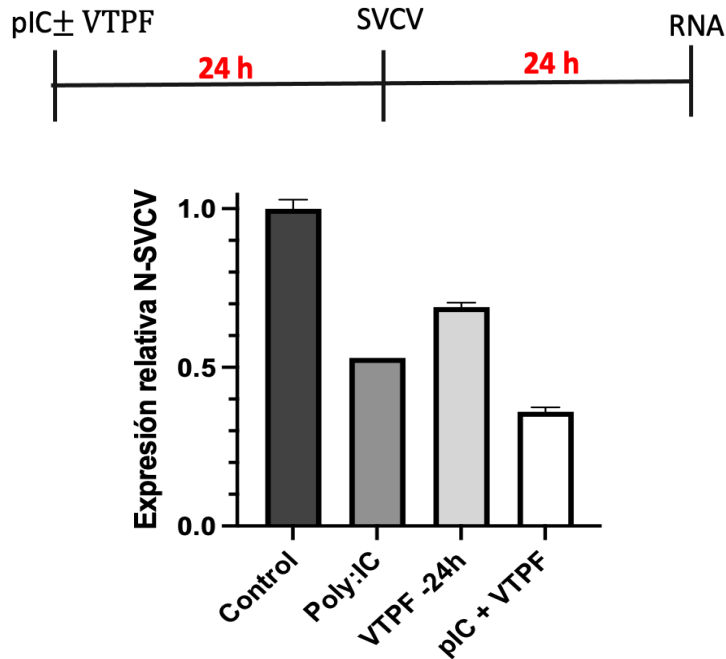
En un primer experimento, se añadió el poly I:C 20 µg/mL a los correspondientes pocillos dejándolo actuar durante 2 h. Transcurrido ese tiempo se retiró el medio y se añadió medio RPMI 2%. Al mismo tiempo se añadió la VTPF 0,5 µM a los correspondientes pocillos dejándolo actuar durante 24 horas. Finalizado el tiempo, se procedió a la infección de los pocillos con SVCV 0,02 virus/célula dejándolo actuar durante 24 h. Finalmente, se recogió el RNA para evaluar la expresión del gen N de SVCV mediante RT-qPCR.



**Figura 11.** Cuantificación por qPCR del efecto de la VTPF (-24h) 0,5  $\mu$ M y poly I:C 20  $\mu$ g/mL (2h) sobre la expresión relativa del gen N de SVCV  $moi = 0,02$  sobre EPC a las 24 hpi. Los resultados de la qPCR fueron procesados mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Cada barra representa el promedio del duplicado con su desviación estándar. A la medida del control de EPC infectadas con SVCV se le asignó el valor de 1.

Nuestros resultados de la [figura 11](#) muestran la inhibición de la expresión del gen N de SVCV. El control poly I:C muestra una inhibición del 85% con el pretratamiento durante 2 horas. Mientras que el compuesto añadido antes de la infección (-24 h) tiene una inhibición del 75 %. Este resultado sugiere una capacidad de la VTPF de inducir un estado antiviral.

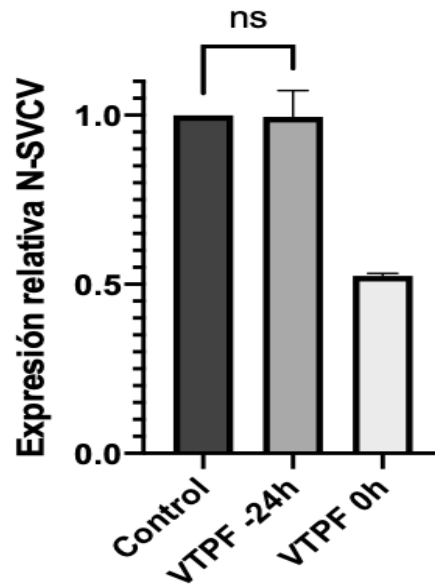
También, con el objetivo de ver qué ocurría con la expresión de SVCV al cambiar la duración del tratamiento con poly I:C, realizamos un segundo experimento. En este caso, en lugar de un tratamiento de dos horas se realizó durante 24 horas. Por tanto, el procedimiento realizado para llevar a cabo el experimento fue el mismo que en el anterior.



**Figura 12.** Cuantificación por qPCR del efecto de la VTPF 0,5  $\mu$ M (-24h) y poly I:C 20  $\mu$ g/mL (24 h) sobre la expresión del gen N de SVCV  $moi = 0,02$  sobre EPC a las 24 hpi. Los resultados de la qPCR fueron procesados mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Cada barra representa el promedio del duplicado con su desviación estándar, teniendo en cuenta el duplicado del control como 1.

Al igual que el experimento mostrado en la [figura 11](#), la combinación poly I:C + VTPF es la que produjo una mayor inhibición (70%) de SVCV superior a los componentes por separado, ya que poly I:C muestra una inhibición del 50%, y VTPF una inhibición del 35% (figura 12). Este resultado nos indica una capacidad antiviral de la VTPF.

Hasta ahora, las tomas de muestras para evaluar la expresión del gen N de SVCV eran a las 24 hpi. Para conocer mejor el efecto de VTPF sobre la replicación de SVCV, quisimos ver qué ocurría a tiempos más tardíos de infección (72 hpi). Para ello, se hizo un pretratamiento (-24 h) a las células con VTPF 0,5  $\mu$ M. Finalizado el tiempo, se retiró el medio, se procedió a la infección con SVCV 0,02 virus/célula dejándolo actuar durante 72 h. También queríamos ver qué ocurría si añadíamos la VTPF junto con el virus (+0h), y dejando actuar 72 horas también. Finalmente, se recogieron las células para evaluar la expresión del gen N de SVCV.



**Figura 13.** Cuantificación por qPCR del efecto de la VTPF 0,5  $\mu$ M (-24h y 0h) sobre la expresión relativa del gen N de SVCV  $moi= 0,02$  sobre EPC a las 72 hpi. Los resultados de la qPCR fueron procesados mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Cada barra representa el promedio del duplicado con su desviación estándar, teniendo en cuenta el duplicado del control como 1. ns= no significativo.

Cuando se añadió la VTPF al inicio de la infección se produjo una inhibición del 50%, mientras que el pretratamiento con el compuesto no produjo una inhibición figura 13.

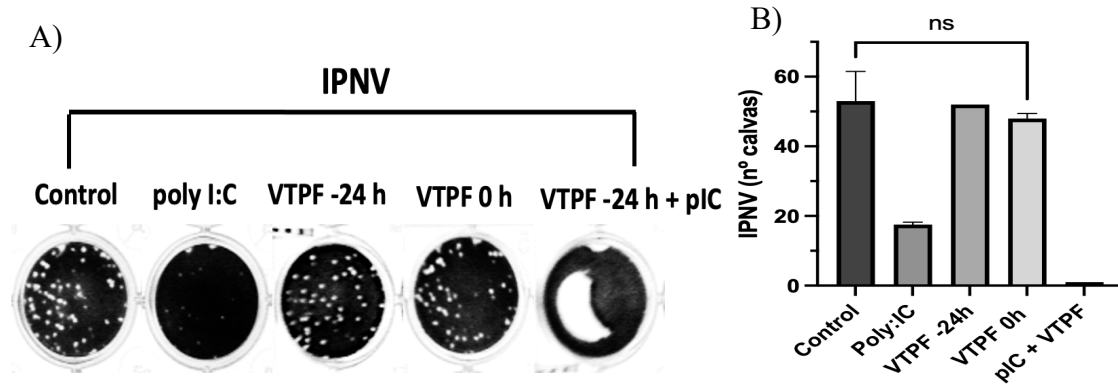
### 5.3 Efecto de la VTPF sobre infectividad del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV).

En los siguientes ensayos decidimos probar el efecto de la VTPF sobre un virus distinto a SVCV, como es el IPNV. La característica diferencial de este virus con respecto al otro es que IPNV no tiene envoltura lipídica y su genoma es ARN bicatenario.

#### 5.3.1 Ensayo de formación de calvas

Para poner a punto el ensayo, una vez que las células alcanzaron una confluencia del 100%, añadimos poly I:C 20  $\mu$ g/mL y VTPF 0,5  $\mu$ M a los correspondientes pocillos durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, infectamos toda la

placa con el virus IPNV usando la cantidad de 150 virus/pocillo durante 90 minutos. Seguidamente, se retiró el medio y se añadió el compuesto diluido en metilcelulosa 75%, dejándolo actuar durante 3 días y se procedió a la tinción con cristal violeta.



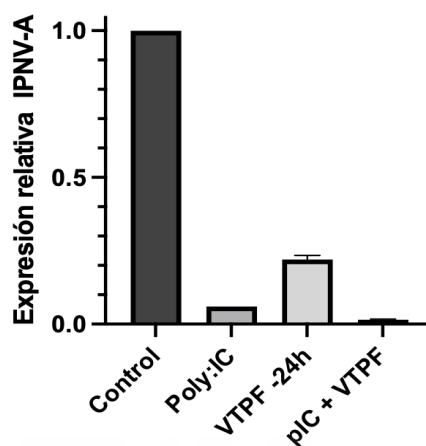
**Figura 14.** Evaluación del efecto de la VTPF 0,5  $\mu$ M (-24 h y 0 h) y poly I:C 20  $\mu$ g/mL (24h) sobre la infección con IPNV en EPC (150 virus/pocillo) mediante ensayo de formación de calvas usando metilcelulosa y tinción con cristalvioleta a los 3dpi. A) Imagen representativa de los puntos del experimento. B) Número de calvas del experimento representado estadísticamente, cada barra representa el promedio de un duplicado y su error. ns= no significativo

Se observa la formación de calvas en todos los pocillos exceptuando el doble tratamiento pIC +VTPF (figura 14.A). Para poder hacer una comparativa del ensayo procedimos al conteo del número de calvas, nuestros resultados muestran la inhibición del 35% de la replicación de IPNV con el control poly I:C, mientras que con el tratamiento del compuesto durante la infección se produce más inhibición que con el pretratamiento pero no es estadísticamente significativo (figura 14.B).

### 5.3.2 Inhibición de la síntesis de RNA de IPNV

Con el objetivo de ver también el efecto de VTPF sobre la síntesis de RNA del virus, decidimos evaluar la expresión relativa del segmento A de IPNV mediante qPCR.

Para ello, se sembró una placa con células EPC y se hizo un pretratamiento a las células con VTPF 0,5  $\mu$ M y poly I:C 20  $\mu$ g/mL en los correspondientes pocillos durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se retiró el medio y se infectó toda la placa con IPNV a una multiplicidad de infección de 0,02 virus/célula. A las 24 horas se recogieron las células para analizar la síntesis de RNA de IPNV mediante qPCR.



**Figura 15.** Cuantificación por qPCR del efecto de la VTPF 0,5  $\mu$ M sobre la expresión relativa del segmento A de IPNV moi= 0,02 sobre EPC a las 24 hpi. Los resultados de la qPCR fueron procesados mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Cada barra representa el promedio del duplicado con su desviación estándar, asignando al duplicado del control infectado el valor de 1.

Todos los tratamientos dan lugar a una inhibición de la expresión del segmento A de IPNV. El control del poly I:C tiene una inhibición del 90%, mientras que el pretratamiento con VTPF muestra una inhibición del 80 % en la [figura 15](#). Por tanto, este ensayo nos muestra la actividad antiviral de la VTPF sobre la síntesis de RNA de IPNV.

#### **5.4 Efecto de VTPF sobre acción antiviral de poly I:C.**

Como se ha mencionado con anterioridad, la molécula de poly I:C es un estimulador de la vía del interferón e inhibe la replicación del virus. En todos los ensayos realizados, tanto de formación de calvas como de qPCR, se ha visto la inhibición de la replicación del virus en mayor o menor medida con el tratamiento de poly I: C.

También en todos los ensayos en los que se ha utilizado como control el poly I:C hemos añadido un doble tratamiento a las células con la VTPF + poly I:C. Hemos visto que el doble tratamiento producía una mayor inhibición de la replicación viral tanto en SVCV como IPNV.

## 5.5. Efecto de la VTPF sobre genes inducidos por interferón (IFITM)

Por último, quisimos estudiar el efecto de la VTPF sobre la expresión de los genes ifitm1 e ifitm5 en la línea celular usada en todos los ensayos, que son las células EPC procedentes de la especie *Pimephales promelas* (un pez similar a la carpa). Se escogieron estos genes por el papel, relevante que tienen en la inhibición de infecciones víricas, como se ha descrito en la introducción.

### 5.5.1 Predicción modelo estructural 3D de IFITM1 e IFITM3/5 de pez cebra.

Estábamos interesados en obtener un modelo de predicción de la estructura 3D de ambos genes. Para ello, en la base de datos de Uniprot: <https://www.uniprot.org> se buscaron los términos “IFITM1” e “IFITM5”. Obteniendo las secuencias correspondientes a pez cebra (*Danio rerio*). En uniprot obtuvimos los correspondientes códigos de identificación: [A5WUL9](#) y [D3YGT6](#). Seguidamente, en la base de datos: <https://alphafold.ebi.ac.uk> se introdujeron los códigos obtenidos de uniprot, obteniendo la secuencia y modelo estructural 3D correspondiente.

A)

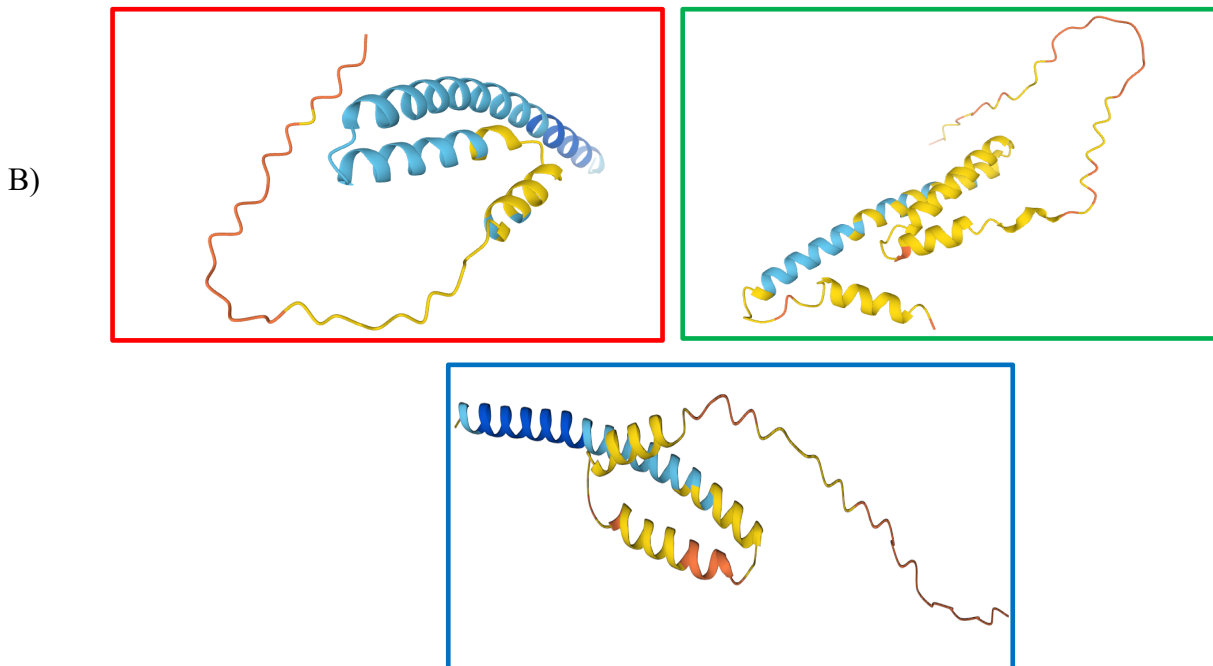
1	11	21	31	41	51	61	71	81	91	101	111						
MQSYPLRGNPMQDDKTCNGQ	PVVVSM	PAQK	LDDDI	IIFSTF	NFHYCN	PCCLG	FAGAFYNSVK	ARDRRL	LLGDY	ASASTYG	TRARRLN	IASVIL	GVLYG	ILLIV	ILVYAY	QLSR	FSHQ

1	11	21	31	41	51	61	71	81	91	101	111	121								
MDNATYSYVNDCTPLTNCKA	GRKAGG	STVVN	MSHAGK	KPPNDY	LWVSL	CNTLYV	NFCCLG	FMALIYS	IKARDQ	KTLD	MR	AAQEC	SDKAK	WYNIL	ASGWN	LLIPL	LVLGL	LVLLLV	HLS	SE
	131	141																		
GTFFDF	FGED	DGFQ	SFMK	LFSR																

1	11	21	31	41	51	61	71	81	91	101	111	121									
MHKEEHEVAVL	GPPSTIL	PRSTVIN	HSETSP	VDHVVWS	LENTL	FLNWC	CLGFIA	FAYS	VKSRDR	KMVG	DVTGAQ	AYAS	TAKCL	NIWAL	ILGIL	MTIGF	ILLLV	FVGS	VT	VYHIM	LQIQEK
RGY																					



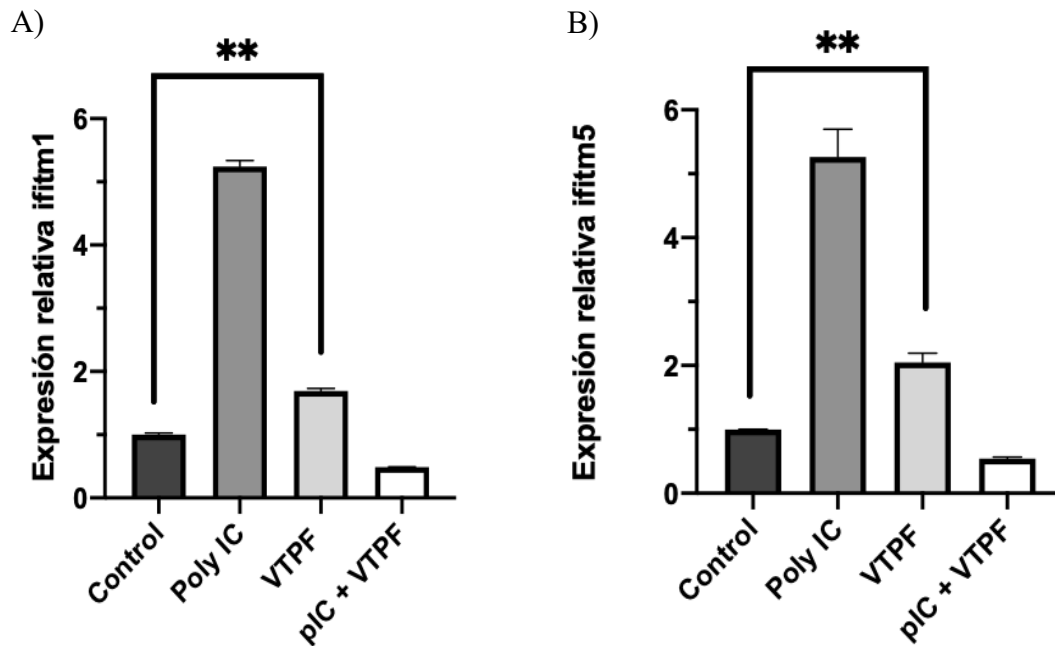
**Figura 16.** Secuencias y modelo 3D de IFITM1, IFITM5 de pez cebra (*Danio rerio*) e IFITM1 de *Homo sapiens*. A) Secuencias de nucleótidos rojo=IFITM1 verde=IFITM5 azul= IFITM1 humana. B) Modelos 3D.

Se hizo un alineamiento de pares de secuencias de nucleótidos para ver el grado de identidad entre IFITM1 *Danio rerio* e IFITM1 *Homo sapiens*. Para ello, se utilizó la herramienta Needle EMBOSS [https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) obteniendo una identidad de 31,2 %.

### 5.5.2 Expresión relativa de genes ifitm en respuesta a VTPF.

Para estudiar el efecto de VTPF sobre la expresión de los genes ifitm se añadieron a las células EPC poly I:C 20 µg/mL a los correspondientes pocillos, dejándolo actuar durante 2 h. Transcurrido ese tiempo, se retiró el medio y se añadió medio RPMI 2%. Al mismo tiempo se añadió la VTPF 0,5 dejándolo actuar durante 24 horas. Finalmente, se recogieron las células para evaluar la expresión de los genes ifitm1 e ifitm5.



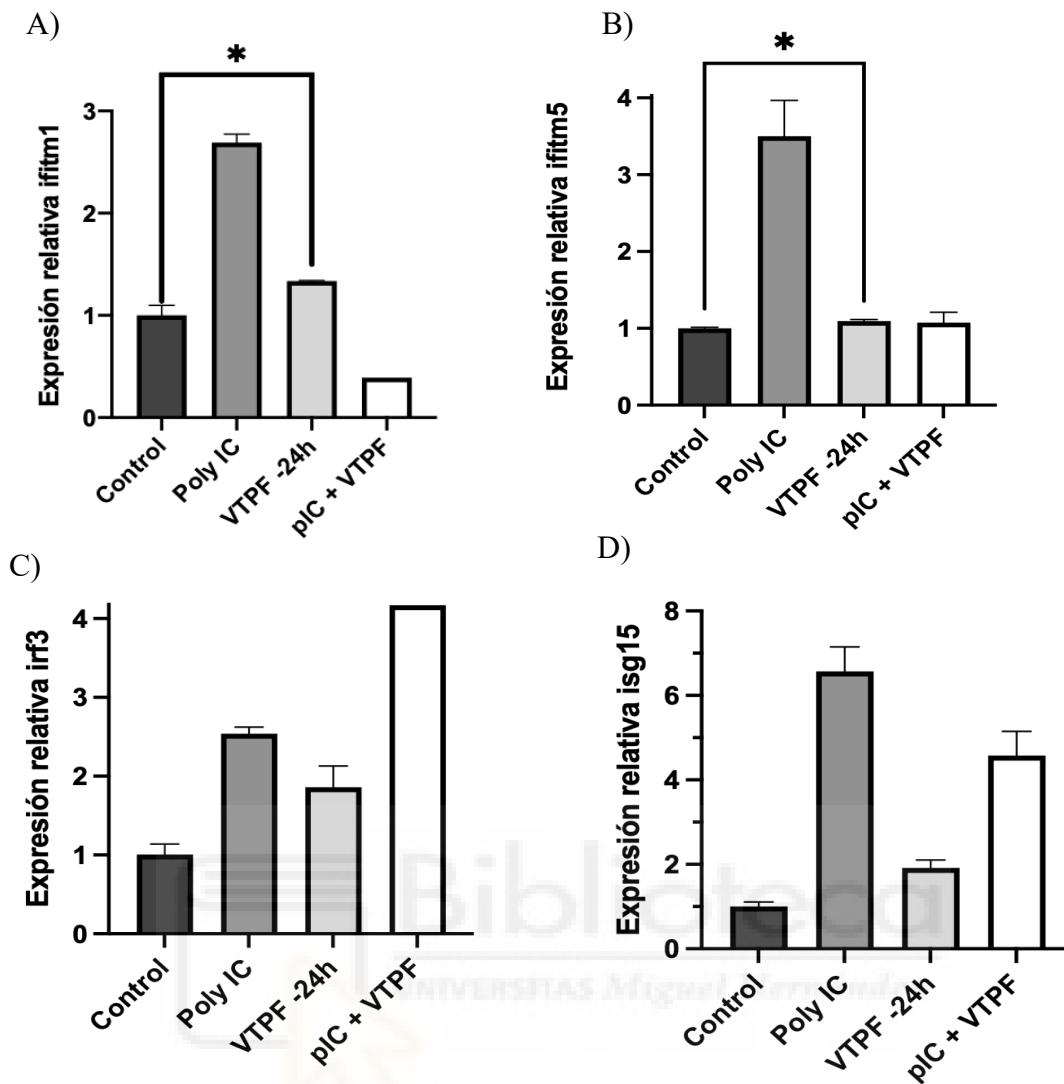


**Figura 17.** A) Cuantificación por qPCR del efecto de la VTPF 0,5  $\mu$ M durante 24h sobre la expresión relativa del gen ifitm1 sobre EPC. B) ifitm5. Los resultados de la qPCR fueron procesados mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Cada barra representa el promedio del duplicado con su desviación estándar, teniendo en cuenta el duplicado del control no tratado como 1. \*\* :  $P < 0.01$

Observamos un aumento de unas 5 veces de la expresión de ifitm1 e ifitm5, por el tratamiento con poly I:C. En el caso del tratamiento con VTPF se observa una pequeña estimulación que es estadísticamente significativa (figura 17).

### 5.5.3. Expresión relativa genes relacionados con respuesta inmune innata.

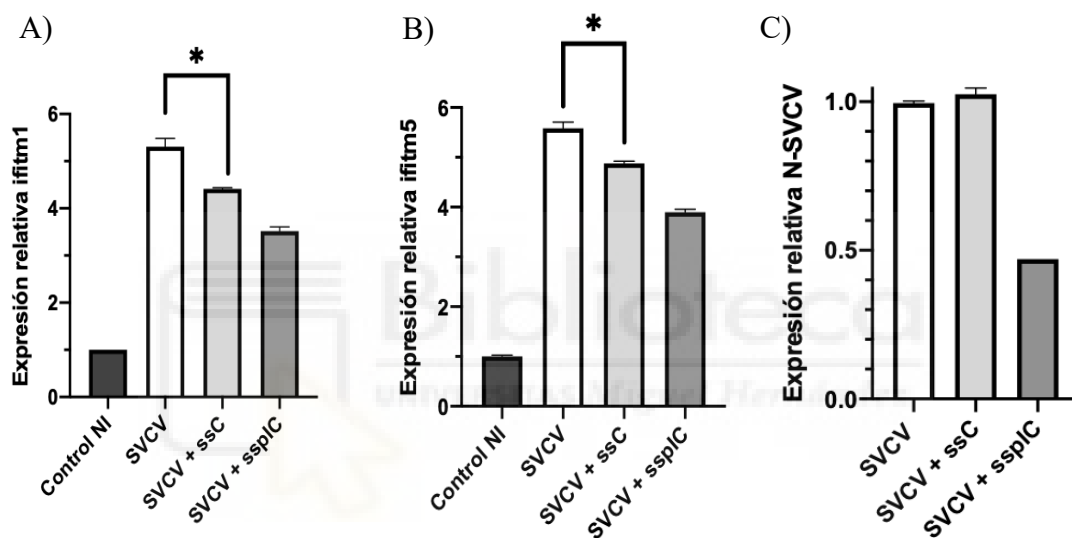
Para profundizar en el efecto de VTPF sobre la respuesta celular mediada por interferón utilizamos otros genes relacionados con la respuesta inmune innata como son: el gen estimulado por interferón 15kDa (isg15) y el factor regulador de interferón 3 (irf3). Para ello, la parte experimental realizada fue la misma que el experimento anterior. Pero, en este caso se evaluó, además de la expresión de ifitm1 e ifitm5, la de los genes isg15 e irf3.



**Figura 18.** A) Cuantificación por qPCR del efecto de la VTPF 0,5  $\mu$ M sobre la expresión en células EPC de los genes A) ifitm1. B) ifitm5. C) irf3. D) isg15. Los resultados de la qPCR fueron procesados mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Cada barra representa el promedio del duplicado con su desviación estándar, teniendo en cuenta el duplicado del control no tratado como 1. \* : P < 0.05.

En el resultado obtenido (figura 18) vuelven a confirmar los resultados obtenidos del experimento anterior (figura 17) relacionados con la expresión de ifitm1 e ifitm5. Con respecto a la expresión de los otros genes relacionados con la vía del interferón, la mayor expresión de ifitm1, ifitm5 e isg15 se observa con el tratamiento de poly I: C. Mientras que el tratamiento de 24h con VTPF produce una estimulación pequeña, aunque significativa, de los genes. El comportamiento del gen irf3 es diferente, puede ser porque va antes “upstream” de interferón, siendo mayor la estimulación con polyI:C + VTPF.

Puesto que tanto el interferón como otras citoquinas se secretan al medio, quisimos ver si los sobrenadantes generados de las células tratadas con medio RPMI 2% o con poly I:C tenían o no efecto en la expresión de los genes inducidos por interferón (IFITM) y contra la infección vírica. Para ello, se sembró una placa de 24 pocillos con células EPC y cuando se alcanzó una confluencia del 100%, se añadieron sobrenadantes: sobrenadante control con RPMI 2% (ssC) y sobrenadante poly I:C (ssPIC) durante 24 h. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se añadió el virus SVCV a una  $moi = 0,02$  virus/célula durante 24 h. Finalmente, se recogió el RNA para la realización del ensayo qPCR.



**Figura 19.** A) Cuantificación por qPCR del efecto de sobrenadantes: de células control (ssC) y de células tratadas con poly I:C (ssPIC) sobre la expresión relativa del gen ifitm1 sobre EPC infectadas con SVCV. B) ifitm5. C) SVCV-N. Los resultados de la qPCR fueron procesados mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Cada barra representa el promedio del duplicado con su desviación estándar, teniendo en cuenta el duplicado del control no infectado o infectado como 1. \* :  $P < 0.05$ .

Se muestra el mismo perfil de expresión con los genes ifitm1 e ifitm5. Observándose que con el virus SVCV aumenta la expresión de ambos genes 5 veces y con los sobrenadantes disminuye la expresión con respecto a la muestra con el virus. En el caso de la expresión de SVCV podemos ver que el sobrenadante control no tiene ningún efecto sobre la síntesis de RNA del virus en la inhibición de la replicación, mientras que en las células pretratadas con el medio de células incubado con poly I:C disminuye la replicación de SVCV en un 50% (figura 19).

También, se llevó a cabo un experimento utilizando sobrenadantes de células tratadas con VTPF, pero el resultado no fue concluyente.

## 6.- DISCUSIÓN

### 6.1 Relación entre cáncer, quimiorresistencia y respuesta inmune innata.

Existe una estrecha relación entre el desarrollo del cáncer y el sistema inmunológico. El sistema inmunológico tiene la capacidad de, por un lado, proporcionar un microambiente favorable para el crecimiento tumoral y, por otro lado, detectar y eliminar células tumorales (Gajewski *et al.*, 2013).

Estudios previos realizados en el laboratorio de Oncología Molecular del Dr. Miguel Saceda (IDiBE-FISABIO) han conseguido identificar la sobreexpresión de genes clave en la respuesta inmune innata en muestras de cáncer de colon, cáncer de mama y en la línea celular eritroleucémica K562 durante el proceso de adquisición de resistencia a tratamiento quimioterapéutico: 5-Fluoracilo (5-FU) y carmustina (BCNU). Estos genes identificados se corresponden a genes inducidos por interferón: el gen de la proteína de resistencia a myxovirus (Mx), genes de proteínas transmembrana inducidas por interferón (IFITM) y el gen de la proteína isg15. Estos resultados obtenidos plantean que puede existir una relación entre la respuesta inmune innata, la transformación neoplásica de las células y la adquisición de resistencia a fármacos.

### 6.2 Modelo VTPF-SVCV-EPC.

Para llevar a cabo esta investigación, el modelo experimental usado fue el compuesto antitumoral Verteporfina, el virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV) y la línea celular de la carpa (EPC). Este modelo EPC-SVCV ha sido utilizado ampliamente en

nuestro laboratorio. En dos trabajos fin de grado anteriores (Gumiel 2020) (Talavera 2021) se obtuvieron datos preliminares sobre la acción de compuestos antitumorales en células de pez infectadas por virus.

Comenzando por el primer trabajo (Gumiel, 2020) se investigó el papel de compuestos de uso común en tratamientos de antitumorales y de enfermedades degenerativas, siendo estos el 5-fluorouracilo (5-FU), la carmustina (BCNU) y la verteporfina (VTPF). El objetivo de este trabajo era observar la relación entre compuestos antitumorales y la respuesta antiviral. Los compuestos mencionados fueron ensayados en sistemas de infección lítica con el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) y de infección persistente (tanto con VHSV como IPNV) utilizando como línea celular la carpa. Se vio que 5-FU aumentaba la síntesis de RNA de VHSV durante las primeras horas de infección, pero a tiempos más largos (4 dpi) inhibía la replicación del virus. También, la carmustina aumentó la infectividad viral, sin resultar tóxica para las células. Finalmente, la verteporfina no demostró un efecto significativo en la infección viral, dando además resultados muy variables.

El segundo trabajo (Talavera, 2021) se centró en estudiar el efecto de los compuestos 5-FU y VTPF en la replicación de SVCV y sobre la expresión de genes ifitm de pez usando una línea celular de pez cebra (ZF4). Los resultados obtenidos mostraron una limitada actividad antiviral tras 24 horas de tratamiento con el 5-FU, sin apreciarse cambios significativos en la expresión de ifitm. Mientras que el pretratamiento de las células durante 24 horas con VTPF 0,5  $\mu$ M parecía inhibir la replicación de SVCV y los niveles de expresión de genes ifitm.

Por tanto, a raíz de estos resultados obtenidos decidimos continuar la investigación. Centrándonos en el antitumoral VTPF por los resultados preliminares obtenidos de su capacidad de actividad antiviral contra SVCV, utilizando otra línea celular (EPC) que suele tolerar mejor los tratamientos con fármacos. Los efectos de VTPF sobre la replicación de SARS-CoV-2 publicado por otros autores (Gu *et al.*, 2020), así como la descripción de VTPF como un posible inhibidor de una de las rutas que llevan a la activación de la respuesta inmune innata (Wang *et al.*, 2020), hicieron que nos centrásemos en este compuesto.

### 6.3 Efecto de VTPF sobre la infectividad de SVCV.

En este trabajo el antitumoral que se ha usado es la Verteporfina que como se ha comentado con anterioridad se ha descrito que inhibe la vía de YAP, la cual desempeña un papel importante en la progresión del cáncer (Wang *et al.*, 2019). Nuestros resultados muestran que la VTPF no es tóxica hasta 2  $\mu\text{M}$  y observándose un efecto protector frente a SVCV a concentraciones entre 0,5-1  $\mu\text{M}$  cuando la VTPF está presente durante la infección. Además, en los ensayos de formación de calvas en el pretratamiento de las células con VTPF se produce una inhibición, pero no es estadísticamente significativa a los 4dpi mientras que a los 3dpi en el pretratamiento y al añadir el compuesto junto con el virus (0 h) no hay inhibición. Estas diferencias podrían deberse por ser un ensayo en el que tiene lugar más rondas de replicación del virus, y es posible que para que pueda observarse bien el efecto antiviral de VTPF se necesite aumentar la duración del pretratamiento o dejar la infección más días. En los experimentos de qPCR sí que se observa una inhibición de síntesis de RNA de SVCV a las 24 hpi con el pretratamiento de VTPF, aunque en 24h estimamos que se ha producido una ronda de replicación del virus. Esto es similar a lo que ocurre en células ZF4 a una concentración de 0,5 $\mu\text{M}$  (Talavera, 2021). Sin embargo, incluso a las 72 hpi, el pretratamiento con el compuesto no parece tener actividad antiviral. Pero cuando la VTPF se añade junto con el virus y se mantiene durante la infección, resulta en una inhibición de la replicación de SVCV del 50%. Para conocer más acerca de como está actuando la VTPF, se podría dejar la infección durante 2 días como se ha visto en las células epiteliales de las vías respiratorias humanas (Calu-3) una disminución en la replicación del SARS-CoV-2 a las 48 hpi a causa del pretratamiento con VTPF 1  $\mu\text{M}$  durante 24 horas (Garcia *et al.*, 2022). También habría que probar a añadir el compuesto después de la infección, en células Vero se ha visto la inhibición del RNA viral de SARS-CoV-2 usando 1.25  $\mu\text{M}$  de VTPF antes de la infección viral, durante la entrada viral y después de la entrada viral a 2dpi (Gu *et al.*, 2021).

Además de SVCV, en este trabajo se probó otro virus de pez perteneciente a una familia distinta (*Birnaviridae*) como es el IPNV. Este virus tiene un genoma de ARN bicatenario, considerado un potente inductor de interferón, al igual que el poly I:C (Lin *et al.*, 2001) por lo que la VTPF podría actuar de una forma distinta. En el ensayo de calvas no se

observa ninguna diferencia con respecto al obtenido con SVCV mientras que en la qPCR ocurre igual que SVCV una inhibición, pero en este caso un poco mayor. También sería interesante estudiar el efecto de VTPF en un virus DNA de pez, si bien en el laboratorio no disponemos en la actualidad de un virus de este tipo.

La autofagia es un componente importante de la respuesta del huésped contra los agentes infecciosos, interviene tanto en las funciones de vigilancia como en las funciones efectoras que intervienen en la detección y eliminación de los virus. La autofagia inhibe la replicación del rhabdovirus de peces debido a que se ha visto que la glicoproteína G de los virus: septicemia hemorrágica viral (VHSV) y viremia primaveral de la carpa (SVCV) en ausencia de otros componentes virales, es suficiente para inducir el programa autofágico antiviral de una célula de pez cebra (ZF4) (Garcia-Valtanen et al., 2014). También se ha evaluado el papel de la autofagia en la replicación viral de SVCV sobre la línea celular EPC. Se ha descrito que la autofagia se activa estas células cuando son infectadas por el SVCV y que la G de SVCV activa la autofagia por lo que se ha propuesto la supresión de la autofagia como un nuevo medio para restringir la replicación viral del SVCV (Liu et al., 2015). No es fácil determinar el papel de la VTPF sobre las células y como hemos mencionado con anterioridad la relación de la VTPF con la autofagia ya que la vía hippo-YAP está implicada en la regulación de la autofagia decidimos estudiarlo. Para ello, utilizamos un inductor de autofagia como es el compuesto rapamicina. Sin embargo, no obtuvimos ningún resultado claro, si bien VTPF parecía recuperar la síntesis de RNA de SVCV de la inhibición causada por la rapamicina (resultado no mostrado).

El 5-Fluorouracilo (5-FU) es un antitumoral utilizado en el tratamiento del cáncer de colon, mama y cuello. Es un compuesto con una estructura parecida a la de las moléculas de pirimidina del ADN y el ARN; es un análogo del uracilo por lo que debido a su estructura interfiere en el metabolismo de los nucleósidos y puede incorporarse al ARN y al ADN, provocando citotoxicidad y muerte celular (Zhang et al., 2008). En células Vero se ha visto la capacidad antiviral del 5-FU al inhibir la producción de partículas infecciosas y alteración de la nucleocápside del virus de la peste bovina (RPV) a una concentración

de 1 microgramo/ml del compuesto (Ghosh et al., 1996). En nuestro laboratorio se ha probado el 5-FU en células de pez cebra (ZF4) infectadas con SVCV. Se ha visto una reducida actividad antiviral del 5-FU 100  $\mu$ M y 200  $\mu$ M (Talavera *et al.*, 2021). En todo caso hay que tener en cuenta que el 5-FU, por su condición de análogo de nucleótido, puede tener otros efectos sobre la síntesis de RNA del virus, distintos de los de la VTPF (Nichol *et al.*, 1967).

#### **6.4 El papel de las proteínas transmembrana inducidas por interferón (IFITM).**

La familia de los genes que codifican unas proteínas transmembrana inducidas por interferón (IFITM), pertenece al grupo de los ISGs (genes estimulados por interferón) y codifica una serie de proteínas homólogas que se encuentran en las membranas plasmáticas y endolisosomal (Yáñez et al., 2019). Como se ha comentado con anterioridad, las IFITM se encuentran en todos los vertebrados y poseen la capacidad de inhibir la infección de muchos virus (Ren *et al.*, 2020). Por ello nuestro interés en estas proteínas IFITM de entre todas las proteínas de respuesta mediada por interferón.

En peces se ha demostrado que los genes *ifitm* responden cuando se tratan las células con el RNA bicatenario sintético poly I:C. Esto se demostró clonando un homólogo de IFITM1 a partir de bazo de la corvina amarilla grande *Pseudosciaena crocea* (*LyclFITM1*), y tras la inducción con poly I:C, la expresión del gen *LyclFITM1* fue regulada al alza en distintos tejidos a las 24 horas de la estimulación (Wan et al., 2008). Nuestros resultados lo corroboran: es decir, con el tratamiento de poly I:C en las células aumentan la expresión 3-5 veces de *ifitm1* e *ifitm5*, pero también de otros genes relacionados con la respuesta inmune como son: *isg15* e *irf3*, aumentando 2 y 5 veces respectivamente. En cuanto el pretratamiento con VTPF en las células, se produce un aumento en la expresión de *ifitm1*, pero en menor proporción *irf3*, *isg15* pudiendo ser que otros genes modulados por interferón se vean afectados por el tratamiento con VTPF, como se ha observado en otras líneas celulares de pez (Zhang et al. 2021).



En cuanto a la relación de la respuesta inmune sobre la infección viral, en este trabajo, utilizamos las células EPC procedentes de la especie *Pimephales promelas*, en la que se han encontrado las proteínas IFITM1 e IFITM5. La localización intracelular de estas proteínas de esta especie todavía es desconocida. Sin embargo, en otras especies se ha publicado en relación con la proteína IFITM1. La proteína IFITM1 de *Paralichthys olivaceus* funciona como un efector clave de la inmunidad innata para restringir la replicación del virus en los vertebrados inferiores por su potente actividad antiviral contra virus de DNA *Rana grylio* (RGV), y virus RNA como el rhabdovirus *Scophthalmus maximus* (SMRV) (Zhu et al., 2013). También se clonó un homólogo de la IFITM1 del mero moteado naranja (*Epinephelus coioides*) (EciFITM1). La expresión ectópica de EciFITM1 inhibió significativamente la replicación de iridovirus del mero de Singapur (SGIV) o por el virus de la necrosis nerviosa del mero de manchas rojas (RGNNV) lo que se demostró por la reducción de la producción de virus, así como de los niveles de transcripción de genes virales y de expresión de proteínas (Zhang et al., 2021). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran un aumento de la expresión 5-6 veces de ifitm1 e ifitm5 en las células infectadas con SVCV puede ser que en células tratadas con poly I:C antes de la infección esté ocurriendo el bloqueo de la entrada de SVCV. Por el contrario, se ha visto que este mismo virus en la línea celular ZF4 inhibe la expresión de ifitm (Talavera, 2021). Los sobrenadantes con poly I:C muestran actividad antiviral frente a SVCV. Sin embargo, SVCV es el inductor de la expresión de los genes de ifitm debido a que la infección viral induce al interferón.

## 7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

De este trabajo podemos extraer las siguientes conclusiones:

- VTPF parece ejercer un efecto protector contra SVCV (a la concentración 0,5  $\mu$ M) cuando está presente durante la infección.
- La acción antiviral de VTPF se aprecia en los experimentos de supervivencia celular y síntesis de RNA, pero no en los ensayos de formación de calvas.

- VTPF y poly I:C tienen por separado actividad antiviral frente a SVCV, utilizados conjuntamente se consigue una mayor actividad antiviral.
- El tratamiento de las células con VTPF produce la estimulación de genes de la respuesta inmune innata: ifitm1, irf3, isg15.

En cuanto a las perspectivas futuras derivadas de este trabajo podrían ser:

- Poner a punto un ensayo específico de entrada de virus.
- Profundización en el estudio de sobrenadantes procedentes de células tratadas con VTPF.
- Desarrollar anticuerpos frente a IFITM1, IFITM5 de *P.promelas*, para detectar la localización de estas proteínas por inmunofluorescencia.
- Estudiar el efecto de VTPF sobre VHSV, otro rhabdovirus de pez.



### Agradecimiento

Mi agradecimiento y admiración a mi tutor el profesor Luis Pérez García-Estañ por todo su apoyo, su confianza y sus valiosos consejos que ha conseguido que disfrute realizando esta investigación. A mi co-tutor el profesor Miguel Saceda Sánchez por sus aportaciones en esta investigación y por la confianza depositada en mí. A todos los miembros del laboratorio por hacerme sentir un miembro más.

En especial a mi madre...

## 8. BIBLIOGRAFÍA

**Anafu A. A**, Bowen C. H, Chin C. R, Brass A. L, and Holm G. H (2013). “*Interferon-inducible transmembrane protein 3 (IFITM3) restricts reovirus cell entry*”. J. Biol. Chem. 288: 17261–17271.

**Ashraf U**, Lu Y, Lin L, Yuan J, Wang M and Liu X (2016). “*Spring viremia of carp virus: recent advances*”. J. Gen. Virol 97: 1037-1051.

**Avruch J**, Zhou D, Fitamant J, Bardeesy N, Mou F (2012). “*Protein kinases of the Hippo pathway: regulation and substrates*”. Semin Cell Dev Biol 23: 770–784.

**Bailey CC**, Zhong G, Huang IC, Farzan M (2014). “*IFITM-family proteins: the cell’s first line of antiviral defense*”. Annu Rev Virol 1: 261–283.

**Budhwani M**, Mazzeri R and Dolcetti R (2018) “*Plasticity of Type I Interferon-Mediated Responses in Cancer Therapy: From Anti-tumor Immunity to Resistance*”. Frontiers in Oncology 8: 322.

**Byon J.Y**, Ohira T, Hirono I and Aoki T (2006). “*Comparative immune responses in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* after vaccination with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) recombinant glycoprotein and DNA vaccine using a microarray analysis*”. Vaccine 24: 921-30.

**Chen S**, Wang L, Chen J, Zhang L, Wang S, Goraya M.U, Chi X, Na Y, Shao W, Yang Z, Zeng X, Chen S and Chen J.L (2017). “*Avian Interferon-Inducible Transmembrane Protein Family Effectively Restricts Avian Tembusu Virus Infection*”. Front Microbiol 8: 672.

**Collet B**, Munro E.S, Gahlawat S, Acosta F, García J, Roemelt C, Zou J, Secombes C.J, Ellis A.E (2007). “*Infectious pancreatic necrosis virus suppresses type I interferon signalling in rainbow trout gonad cell line but not in Atlantic salmon macrophages*”. Fish Shellfish Immunol 22: 44–56.

**Desai T.M**, Marin M, Chin C.R, Savidis G, Brass A.L and Melikyan G.B (2014). "*IFITM3 restricts influenza A virus entry by blocking the formation of fusion pores following virus-endosome hemifusion*". PLoS Pathog 10: 1004-1048.

**Dios S**, Poisa-Beiro L, Figueras A, Novoa B (2007). "*Suppression subtraction hybridization (SSH) and macroarray techniques reveal differential gene expression profiles in brain of sea bream infected with nodavirus*". Mol Immunol 44: 2195-204.

**Dunn GP**, Koebel CM, Schreiber RD (2006). "Interferons, immunity and cancer immunoediting". Nat Rev Immunol: 6: 836.

**Feng J**, Gou J, Jia J, Yi T, Cui T and Li Z (2016). "*Verteporfin, a suppressor of YAP–TEAD complex, presents promising antitumor properties on ovarian cancer*". Onco Targets Ther 9: 5371–5381.

**Gajewski T.F**, Schreiber H and Fu Y.X (2013). "*Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment*". Nat Immunol 14 (10): 1014-1022.

**Gan Z**, Chen S.N, Huang B, Zou J and Nie P (2019). "*Fish type I and type II interferons: composition, receptor usage, production and function*". Reviews in aquaculture 12(2): 773-804.

**Garcia G**, Wang Y, Irudayam J.I, Jeyachandran A.V, Cario S.C, Sen C, Li S, Li Y, Kumar A, Nielsen-Saines K, French S.W, Shah P.S, Morizono K, Gomperts B, Deb A, Ramaiah A and Arumugaswami V (2022). "*Hippo Signaling Pathway Activation during SARS-CoV-2 Infection Contributes to Host Antiviral Response*" BioRxiv 1.

**Garcia-Valtanen P**, Ortega-Villaizan M, Martinez-Lopez A, Medina-Gali R, Perez L, MacKenzie S, Figueras A, Coll J.M and Estepa A (2014). "*Autophagy-inducing peptides from mammalian VSV and fish VHSV rhabdoviral glycoproteins (G) as models for the development of new therapeutic molecules*". Autophagy 10: 1666–1680.

**Gavini J**, Dommann N, Jakob M.O, Keogh A, Bouchez L.C, Karkampouna S, de Julio M.K, Medova M, Zimmer Y, Schläfli A.M, Tschan M.P, Candinas D, Stroka D and Banz V. “*Verteporfin-induced lysosomal compartment dysregulation potentiates the effect of sorafenib in hepatocellular carcinoma*” (2019). Cell Death and Disease 10: 749.

**Ghosh A**, Nayak R and Shaila M.S (1996). “*Inhibition of replication of rinderpest virus by 5-fluorouracil*”. Antiviral Research. 31: 35-44.

**Gu C**, Wu Y, Guo H, Zhu Y, Xu W, Wang Y, Zhou Y, Sun Z, Cai X, Li Y, Liu J, Huang Z, Yuan Z, Zhang R, Deng Q, Qu D, Xie Y (2021) “*Protoporphyrin IX and verteporfin potently inhibit SARS-CoV-2 infection in vitro and in a mouse model expressing human ACE2*”. Science Bulletin 66: 925-936.

**Gumiel M**, Saceda M, Perez L. “*Efecto de compuestos antitumorales sobre la infectividad de virus de pez*”. Trabajo Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández. Julio 2020.

**Harvey K.F**, Zhang X, Thomas DM (2013). “*The Hippo pathway and human cancer*”. Nat Rev Cancer 13: 246–57.

**Hervas-Stubbs S**, Perez-Gracia JL, Rouzaut A, de Sanmamed MF, Le Bon A, Melero IJ (2011) “*Direct Effects of type I IFNs on cells of the immune system*”. Clin Cancer Res. 17: 2619–27.

**Isaacs A** and Lindenmann (1957). “*Virus interference. I. The interferon*”. Royal society 147: 258-267.

**Jensen I** and Robertsen B (2002) “*Effect of double-stranded RNA and interferon on the antiviral activity of Atlantic salmon cells against infectious salmon anemia virus and infectious pancreatic necrosis virus*”. Fish Shellfish Immunol 13: 221–241.

**Jinushi M** (2012). “*The role of innate immune signals in antitumor immunity*”. Oncolimmunology 1(2): 189–194.

**Kotenko SV**, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK (2003). "*IFN- $\lambda$ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex*". Nat. Immunol 4: 69- 77.

**Leong J.C** (2008). "*Fish viruses*". Encyclopedia of Virology 227–234.

**Li C**, Du S, Tian M, Wang Y, Bai J, Tan P (2018). "*The Host restriction factor interferon-inducible transmembrane protein 3 inhibits vaccinia virus infection*". Front. Immunol 9: 228.

**Liu L**, Zhu B, Wu S, Lin L, Liu G, Zhou Y, Wang W, Asim M, Yuan J, Li L, Wang M, Lu Y, Wang H, Cao J and Liu X (2015). "*Spring viraemia of carp virus induces autophagy for necessary viral replication*". Cell. Microbiol 17(4): 595-605.

**Liao Y**, Goraya M.U, Yuan X, Zhang B, Chiu S.H. and Chen J.L (2019). "*Functional involvement of interferon-inducible transmembrane proteins in antiviral immunity*". Front. Immunol 10: 1097.

**Lorenzen N**, Lorenzen E, Einer-Jensen K, LaPatra S.E (2002). "*DNA vaccines as a tool for analysing the protective immune response against rhabdoviruses in rainbow trout*". Fish Shellfish Immunol 12: 439–453.

**Lin S.B**, Lin C.H and Hsu Y.L (2001). "*Establishment of an antiviral activity assay and the identification and partial purification of interferon-like protein from rainbow trout gonadal cells (RTG-2)*". Zoological Studies 40(3): 240-246.

**McBeath AJ**, Snow M, Secombes C.J, Ellis A.E, Collet B (2007). "*Expression kinetics of interferon and interferon-induced genes in Atlantic salmon (Salmo salar) following infection with infectious pancreatic necrosis virus and infectious salmon anaemia virus*". Fish Shellfish Immunol 22: 230-241.

**McNab F**, Mayer-Barber Katrin, Sher A, Wack A and O'Garra (2015). "A Type I interferons in infectious disease". Nature Reviews Immunology 15: 87-103.

**Meischel T**, Fritzlar S, Villalon-Letelier F, Tessema M.B, Brooks A.G, Reading P.C, and Londrigan S.L (2021). "IFITM Proteins That Restrict the Early Stages of Respiratory Virus Infection Do Not Influence Late-Stage Replication". Front. Immuno 95(20): 837-921.

**Munoz-Moreno R**, Cuesta-Geijo M. A, Martinez-Romero C, Barrado-Gil L, Galindo I and Garcia-Sastre A (2016). "Antiviral role of IFITM proteins in african swine fever virus infection". PLoS One 11(4): 154-336.

**Nichol F.R** and Tershak D.R (1967). "Effects of 5-Flurouracil and 6-Azauridine on interferon action". J. Virol 1(2): 450-451.

**OIE (2019)** Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals: <https://www.oie.int/en/standard-setting/aquatic-manual/access-online/>

**Parker BS**, Rautela J, Hertzog PJ (2016). "Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy". Nat Rev Cancer 16: 131.

**Pellosis D.S**, Calori I.R, de Paula L.B, Hioka N, Quaglia F, Tedesco A.C (2017) "Multifunctional theranostic Pluronic mixed micelles improve targeted photoactivity of Verteporfin in cancer cells". Materials Science and Engineering 71: 1-9.

**Ren L**, Du S, Xu W, Li T, Wu S, Jin N and Li C (2020). "Current Progress on Host Antiviral Factor IFITMs". Front Immunol 11: 543444.

**Scapigliati G**, Buonocore F, Randelli E, Casani D, Meloni S, Zarletti G, Tiberi M, Pietretti D, Boschi I, Manchado M, Martin-Antonio B, Jimenez-Cantizano R, Bovo G, Borghesan F, Lorenzen N, Einer-Jensen K, Adams S, Thompson K, Alonso C, Bejar J, Cano I, Borrego J.J, and Alvarez M.C (2010). "Cellular and molecular immune responses of the sea bass

(*Dicentrarchus labrax*) experimentally infected with betanodavirus". *Fish Shellfish Immunol* 28: 303-311.

**Smith SE**, Busse DC, Binter S, Weston S, Diaz Soria C, Laksono BM, Clare S, Van Nieuwkoop S, Van den Hoogen BG, Clement M, Marsden M, Humphreys IR, Marsh M, de Swart RL, Wash RS, Tregoning JS, Kellam P (2019). "*Interferon-induced transmembrane protein 1 restricts replication of viruses that enter cells via the plasma membrane*". *J Virol* 93: 2003-2018.

**Snell LM**, McGaha TL, Brooks DG. (2017) "*Type I interferon in chronic virus infection and cancer*". *Trends Immunol.* 38: 542–57.

**Sung H**, Ferlay J, Siegel R.L, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A and Bray F. (2021) "*Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*". *CA: a cancer journal for clinicians* 71(3): 209-249.

**Talavera D**, Saceda M, Perez L. "*Efecto de 5-Fluorouracilo y Verteporfina sobre la infectividad y la respuesta inmune innata en infecciones virales en células de pez cebra*". *Trabajo Fin de Grado*. Universidad Miguel Hernández. Julio 2021.

**Verjan N**, Ooi E.L, Nochi T, Kondo H, Hirono I, Aoki T, Kiyono H and Yuki Y (2008). "*A soluble nonglycosylated recombinant infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) G-protein induces IFNs in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)*". *Fish Shellfish Immunol* 25: 170-80.

**Verrier E.R**, Langevin C, Benmansour A and Boudinot P (2011). "*Early antiviral response and virus-induced genes in fish*". *Developmental and Comparative Immunology* 35: 1204–1214.



**Wan X** and Chen X (2008). "Molecular cloning and expression analysis of interferon-inducible transmembrane protein 1 in large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*". Vet Immunol Immunopathol 124(1-2): 99-106.

**Wang C**, Zhu X, Feng W, Yu Y, Jeong K, Guo W, Lu Y and Mills G.B (2016). "Verteporfin inhibits YAP function through up-regulating 14-3-3 $\sigma$  sequestering YAP in the cytoplasm" Am J Cancer Res 6(1): 27–37.

**Wang S**, Zhou L, Ling L, Meng X, Chu F, Zhang S and Zhou F (2020). "The Crosstalk Between Hippo-YAP Pathway and Innate Immunity". Front Immunol 11: 323.

**Wang Z**, Lu W, Zhang Y, Zou F, Jin Z and Zhao T (2019). "The Hippo Pathway and Viral Infections". Front Microbiol 10: 3033.

**Yáñez D.C**, Ross S and Crompton T (2019) "The IFITM protein family in adaptive immunity". Immunology 159: 365-372.

**Yu F.X**, Zhao B and Guan K.L (2015). "Hippo pathway in organ size control, tissue homeostasis, and cancer". Cell 163: 811–28.

**Zhang N**, Yin Y, Xu S.J and Chen W.S (2008). "5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies". Molecules 13(8): 1551-1569.

**Zhang Y**, Wang L, Zheng J, Huang L, Wang S, Huang X, Qin Q and Huang Y (2021). "Group 1 Interferon-Induced Transmembrane Protein 1 Inhibits Iridovirus and Nodavirus Replication by Regulating Virus Entry and Host Lipid Metabolism". Front. Immunol 12: 636-806.

**Zhao X**, Li J, Winkler C.A, An P, Guo J.T. (2018). "IFITM genes, variants, and their roles in the control and pathogenesis of viral infections". Front Microbiol 9: 3228.

**Zhu R**, Wang J, Lei X.Y, Gui J.F and Zhang Q.Y (2013). "*Evidence for *Paralichthys olivaceus* IFITM1 antiviral effect by impeding viral entry into target cells.*" Fish Shellfish Immunol 35: 918-926.

**Zitvogel L**, Galluzzi L, Kepp O, Smyth MJ, Kroemer G (2015) "*Type I interferons in anticancer immunity*". Nature Reviews Immunol 15: 405.

**Zou J** and Secombes C.J (2011). "*Teleost fish interferons and their role in immunity*" Developmental and Comparative Immunology 35: 1376–1387

**Yáñez D.C**, Ross S and Crompton Tessa (2020). "*The IFITM protein family in adaptive immunity*". Immunology 159: 4.

