

TRABAJO FIN DE MÁSTER
MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA Y
BIOINGENIERÍA
CURSO 2022-2023
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

MODULACIÓN DE LA RESPUESTA ANTIVIRAL
EN CÉLULAS DE PEZ BAJO CONDICIONES DE
INFECCIÓN PERSISTENTE

Autora: Estela Tébar Garcerán
Tutor académico: Luis Pérez García-Estañ
Co-tutor: Miguel Saceda Sánchez

D. LUIS PEREZ GARCÍA-ESTAÑ, Doctor y Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

CERTIFICA

Que el presente trabajo titulado:

“Modulación de la respuesta antiviral en células de pez bajo condiciones de infección persistente”

y que constituye la Memoria del Trabajo Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta:

ESTELA TÉBAR GARCERÁN

Ha sido realizado bajo su supervisión en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IdiBE), cumpliendo todos los requisitos necesarios.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado en Elche a 21 de junio de 2023

Fdo.: Prof. Luis Pérez García-Estañ

ABREVIATURAS

2-BP: 2-Bromopalmitato

cDNA: DNA complementario

dpi: días post-infección

dsRNA: RNA de doble cadena

EPC: línea celular epithelioma papulosum cyprini procedente de *Pimephales promelas*

EPC^{IPNV}: línea celular EPC persistentemente infectada con IPNV

IFITM: proteínas transmembrana inducidas por IFN

IFN: interferón

IPNV: virus de la necrosis pancreática infecciosa

ISG: genes estimulados por IFN

moi: Multiplicidad de infección

irf3: gen que codifica el factor de regulación de IFN 3

Mx: proteína de resistencia a myxovirus

PAT: palmitoilo aciltransferasas

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

Poly I:C: ácido polinosínico-policitídico

PRR: receptor de reconocimiento de patógenos

STING: estimulador de genes de IFN

SVCV: virus de la viremia primaveral de la carpa

VHSV: virus de la septicemia hemorrágica viral

VTPF: verteporfina

YAP: proteína asociada a Yes

ZF4: Línea celular de fibroblastos de pez cebra

RESUMEN:

La respuesta inmunitaria innata mediada por interferón (IFN) proporciona una primera línea de defensa contra virus. En este trabajo se ha investigado el efecto de dos posibles moduladores de la respuesta inmunitaria mediada por IFN para observar cómo influyen en la capacidad de replicación de dos virus de importancia en acuicultura: el virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV) y el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV). La verteporfina (VTPF) es un inhibidor de YAP, una proteína implicada en la regulación negativa de la respuesta inmune innata. El 2-Bromopalmitato (2-BP) es un inhibidor de la palmitoilación, que puede actuar sobre proteínas implicadas en la respuesta a IFN. Nuestros resultados sugieren que el pretratamiento de las células con VTPF tiene un efecto protector frente a SVCV y estimula los niveles de expresión de genes presentes en la respuesta inmune innata como: *irf3*, *mx* y *sting*. En el caso de 2-BP, este parece inhibir la replicación de VHSV, aunque no se observan efectos significativos en la expresión de los genes de respuesta inmune innata. Las células EPC persistentemente infectadas con el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) (EPC^{IPNV}) exhiben actividad antiviral. Se ha observado que el uso de VTPF en células EPC^{IPNV} parece aumentar la replicación de IPNV, al tiempo que disminuye la expresión de *mx*.

Palabras clave: Respuesta inmune, verteporfina, 2-Bromopalmitato, virus de pez.

ABSTRACT:

The IFN-mediated innate immune response provides a first line of defense against viruses. In this work, the effect of two potential modulators of the IFN-mediated immune response was investigated to assess how they may influence the replication capacity of two types of fish viruses, spring viraemia of carp virus (SVCV) and viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). Verteporfin (VTPF) is an inhibitor of YAP, a protein involved in the negative regulation of the innate immune response. 2-Bromopalmitate (2-BP) is a non-selective inhibitor of palmitoylation of proteins. Our results suggest that VTPF pre-treatment exhibited a protective effect against SVCV and stimulates the expression levels of innate immune response genes such as: *irf3*, *mx* and *sting*. In the case of 2-BP, it appears to inhibit SVCV replication, although no significant effects on the expression of innate immune response genes are observed. EPC cells persistently infected with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) (EPC^{IPNV}) exhibit antiviral activity. Pre-treatments of EPC^{IPNV} cells with VTPF appears to increase IPNV RNA while reducing *mx* expression levels.

Keywords: Immune response, verteporfin, 2-Bromopalmitate, fish viruses.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	7
1.1 INTRODUCCIÓN.....	7
1.2 RESPUESTA INMUNE INNATA FRENTE A LOS VIRUS EN PECES	7
1.3 MODULADORES DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA.....	10
1.4 VIRUS DE PEZ EMPLEADOS EN ESTE TRABAJO	14
1.5 ANTECEDENTES.....	17
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAL Y MÉTODOS	18
3.1 LÍNEAS CELULARES.....	18
3.2 MEDIOS DE CULTIVO	18
3.3 VIRUS.....	18
3.4 COMPUESTOS.....	19
3.5 ENSAYO DE SUPERVIVENCIA CELULAR	19
3.6 ENSAYO DE FORMACIÓN DE CALVAS.....	20
3.7 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE VTPF Y 2-BP EN EPC Y EPC ^{IPNV}	20
3.8 ENSAYO DE PCR CUANTITATIVA.....	20
3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
4. RESULTADOS	22
4.1 TOXICIDAD DE VTPF Y 2-BP EN CÉLULAS EPC.....	22
4.2 EFECTO DE LOS COMPUESTOS DURANTE LA INFECCIÓN VIRAL	23
4.3 EFECTO DE LOS COMPUESTOS 24 HORAS ANTES DE LA INFECCIÓN VIRAL	24
4.4 EFECTO DE VTPF Y 2-BP SOBRE GENES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA INMUNE INNATA EN EPC	27
4.5 EFECTO DE LOS COMPUESTOS SOBRE CÉLULAS CON RESPUESTA INMUNE ESTIMULADA	29
5. DISCUSIÓN.....	37
5.1 RESPUESTA INMUNE INNATA ANTIVIRAL.....	37
5.2 EFECTO DE VTPF Y 2-BP SOBRE CÉLULAS EN ESTADO BASAL	38
5.3 EFECTO DE VTPF Y 2-BP SOBRE CÉLULAS INMUNOESTIMULADAS	39
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS	41
7. BIBLIOGRAFÍA	42

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 INTRODUCCIÓN

El sistema inmunitario de los vertebrados se clasifica en dos tipos: el sistema inmunitario innato y el sistema inmunitario adaptativo. El sistema inmunitario innato surgió hace más de 600 millones de años y es el primero en responder ante una infección o una enfermedad inicial (Riera et al., 2016). Los componentes del sistema inmunitario innato incluyen: barreras físicas como la piel, procesos celulares como la fagocitosis y componentes humorales como las proteínas solubles. Los elementos de la respuesta inmunitaria innata se encuentran en todos los organismos pluricelulares, y las funciones de estos mecanismos de defensa están muy conservadas entre peces y mamíferos (Smith et al., 2019). Si un patógeno persiste a pesar de las defensas inmunitarias innatas, se recurre al sistema inmunitario adaptativo, que consta de dos mecanismos: la respuesta inmune humoral y la respuesta inmune celular. El sistema inmunitario adaptativo es muy específico para un antígeno concreto y este puede proporcionar una inmunidad duradera (Alberts et al., 2002).

1.2 Respuesta inmune innata frente a los virus en peces

Tras la exposición a un virus, las células, incluidas las de los peces, montan una respuesta antiviral temprana, mediante la activación del sistema inmunitario innato. Se induce la activación de una cascada de genes que acaba en la producción de unas proteínas denominadas «citoquinas», que actúan evitando que se extienda la infección (Zhang y Gui, 2012). Una de estas citoquinas producidas son los interferones (IFN). En peces teleósteos, los IFN se pueden clasificar en 2 grupos, y estos comparten características con los IFN I y III de mamíferos. Los genes de IFN del grupo I se encuentran en todas las especies de peces y se ha demostrado que son inducidos por infecciones víricas (Valero et al., 2015). La unión del IFN tipo I con su receptor desencadena la vía de señalización Janus kinasa – transductora de señales y activadora de la transcripción (JAK-STAT). La señalización JAK-STAT conduce a la producción de genes estimulados por IFN (ISG), induciendo la expresión de cientos de genes antivirales (**Figura 1**).

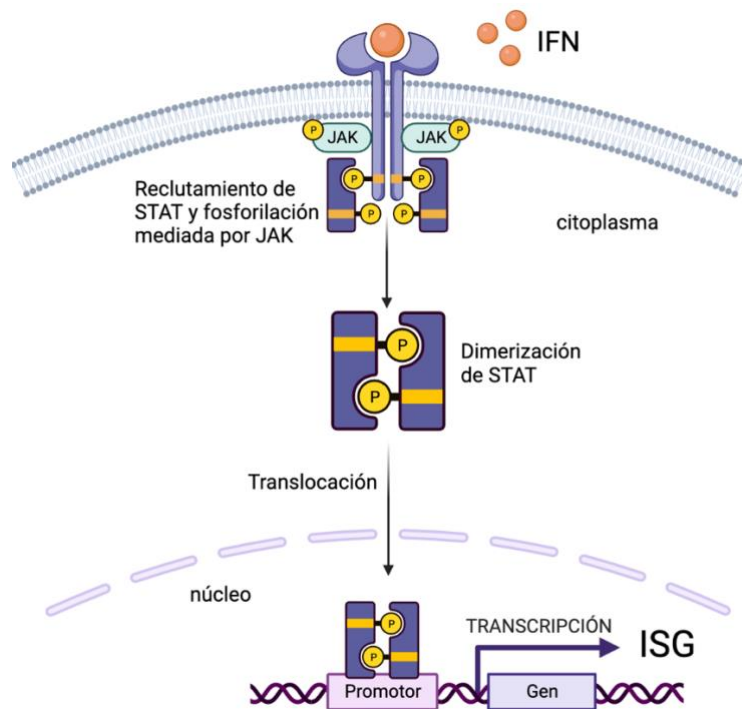


Figura 1. Vía de señalización JAK-STAT en infecciones víricas. Imagen modificada de (Ezeonwumelu et al., 2021) y realizada en Biorender.com

Las ISG codifican las proteínas efectoras que limitan cada paso de la replicación de un virus. La célula sana mantiene estas proteínas a niveles bajos para evitar la activación inapropiada, pero adecuados para poder responder ante posibles infecciones. A su vez, algunas ISG se producen de manera inactiva y permanecen así hasta que la célula se infecta con un virus. El IFN endógeno, el RNA sintético de doble cadena (poly I:C) y la infección vírica son estimulantes comunes de las ISG. Cuando las ISG se acumulan en la célula, se establece lo que se denomina «estado antiviral», en el que la célula queda protegida frente a una infección vírica (**Figura 2**) (Poynter y DeWitte-Orr, 2016).

Las proteínas transmembrana inducidas por IFN (IFITM) son una familia de proteínas que pertenecen a los ISG (Bailey et al., 2014). Las IFITM se localizan en las membranas plasmáticas y endosomales de las células; y participan en la respuesta antiviral (Zhao et al., 2018). Están reconocidas como moléculas efectoras importantes en la respuesta a IFN tipo I frente a múltiples virus de RNA. Sin embargo, también desempeñan otras funciones como: la proliferación celular, la maduración de células

germinales y la mineralización ósea. Existen genes homólogos de la familia IFITM presentes en muchas especies de vertebrados, incluidos los peces, lo que sugiere importantes funciones conservadas para estas proteínas (Yáñez et al., 2020).

En peces, aunque se han identificado cientos de ISG, sólo se ha demostrado la eficacia antivírica de un pequeño subconjunto de ellos (Schneider et al., 2014). Los ISG que podrían considerarse más relevantes en la respuesta a la infección vírica en peces son: el interferón tipo I (*ifn*), la proteína de resistencia a myxovirus (*mx*), el gen estimulado por interferón 15 (*isg15*) y la viperina (*vig*) (Ortega-Villaizan et al., 2022).

Los Rhabdovirus son una de las familias con mayor impacto en la acuicultura. En el caso de los peces del grupo de la carpa, el virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV) es el patógeno vírico más extendido y se ha demostrado que es un potente inductor de los genes *ifn*, *mx*, *isg15* y *vig*. El virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) es uno de los patógenos más letales en acuicultura en salmónidos (World Organisation for Animal Health, 2021) e induce la producción de *ifn*, *mx* y *isg15* (Ortega-Villaizan et al., 2022).

El estudio de la modulación de la respuesta inmunitaria innata es un campo de investigación fundamental para desarrollar nuevas estrategias antivirales, dada la importancia económica de la acuicultura a escala mundial (Poynter y DeWitte-Orr, 2016).

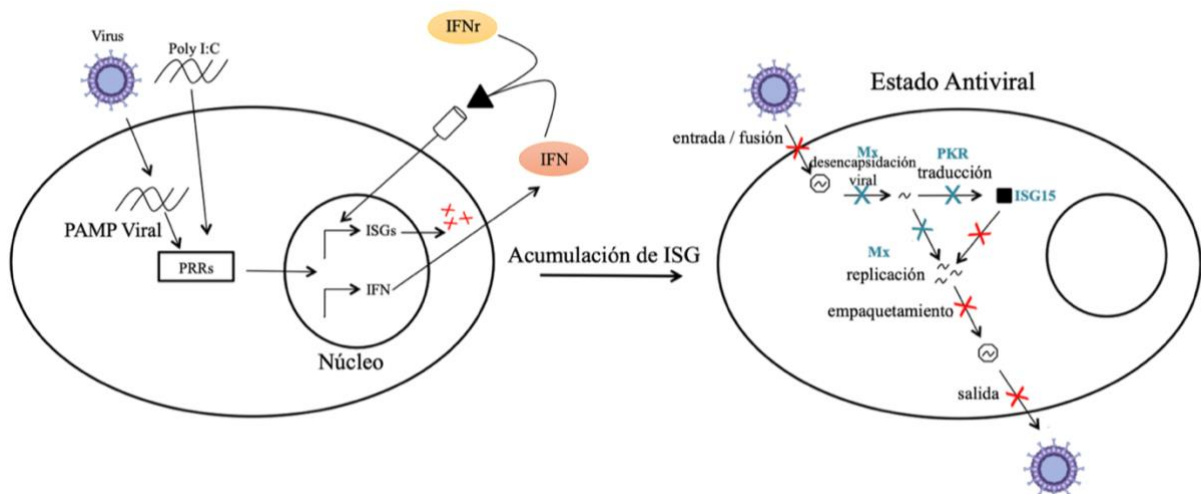


Figura 2. Inducción y función de genes estimulados por IFN. Imagen modificada de (Poynter y DeWitte-Orr, 2016).

1.3 Moduladores de la respuesta inmune innata

1.3.1 La Verteporfina

La Verteporfina (VTPF) es una molécula derivada de la benzoporfirina, que pertenece a la familia de las porfirinas (**Figura 3**). Se extrae de la planta *Tanacetum parthenium* y en el año 2000 fue aprobada por la *Food and Drug Administration* para su uso terapéutico para el tratamiento de la degeneración macular provocada por la edad (Wang et al., 2016).

La VTPF fotoactivada, mediante la incidencia de un láser de 690nm, provoca daños fotoquímicos en las mitocondrias a través de la acumulación de especies reactivas del oxígeno. Esta estrategia se ha estudiado en varios tipos de cáncer como el de próstata, el de pulmón o en osteosarcoma; pero sobre todo, la VTPF como fotosensibilizador está reconocida para el tratamiento de las anomalías vasculares retinianas/coroideas y los tumores intraoculares (Wei y Li, 2020).

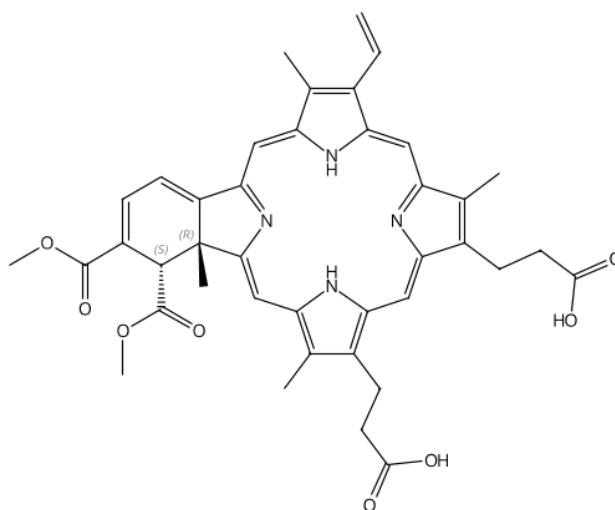


Figura 3. Estructura química de la Verteporfina.

La VTPF no fotoactivada se ha identificado como un inhibidor de la vía de señalización Hippo-YAP. La proteína asociada a Yes (YAP) es un cofactor de transcripción que actúa como efector clave en la vía de señalización de Hippo. La vía Hippo-YAP regula procesos celulares tales como: la proliferación celular, la diferenciación, la supervivencia y la antiapoptosis. Dado que YAP carece de actividad de unión al DNA, su función transcripcional se produce a través de la interacción con factores de transcripción de unión al DNA como TEAD. Juntos forman el complejo YAP-TEAD,

que regula la expresión del gen objetivo. La VTPF bloquea la interacción de YAP con TEAD, por tanto también impide la activación transcripcional de las dianas posteriores de YAP (Huang et al., 2022).

Estudios recientes han demostrado que la respuesta inmune innata está regulada por componentes centrales de la vía Hippo-YAP (Wang et al., 2020). YAP puede inhibir la función del factor regulador de IFN 3 (IRF3) (**Figura 4**), el cual es un agente crítico en la modulación de la transcripción de IFN tipo I y de ISG (Sun et al., 2010).

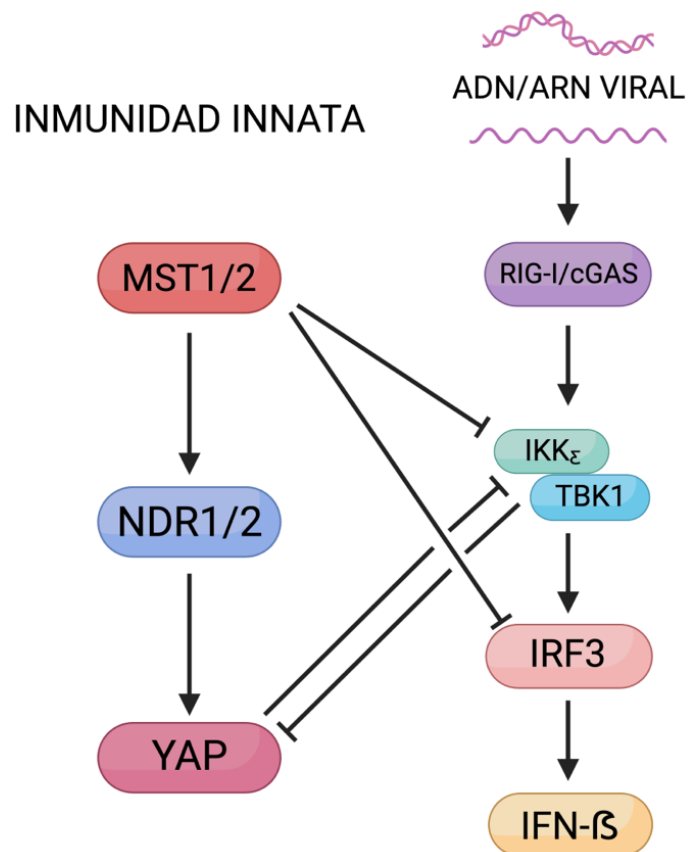


Figura 4. Papel de los componentes de la vía de señalización Hippo-YAP en la respuesta inmune innata. Imagen modificada de (Wang et al., 2020) y realizada en Biorender.com

1.3.2 El 2- Bromopalmitato

El 2-Bromopalmitato (2-BP) (**Figura 5**) es un inhibidor de la S-palmitoilación de proteínas (Lan et al., 2021). La S-palmitoilación es una modificación enzimática postraduccional reversible de proteínas, en la que se produce la unión covalente de un grupo palmitoilo a un aminoácido de cisteína. Las encargadas de la adición del ácido palmítico son las palmitoilo aciltransferasas (PAT) y las responsables de romper el enlace son las acilproteínas tioesterasas (APT). Dado que las PAT contienen dominios de unión a Zn^{2+} y motivos DHHC (Aspartato-Histidina-Histidina-Cisteína) conservados, se consideran parte del grupo de enzimas zDHHC (Li et al., 2022).

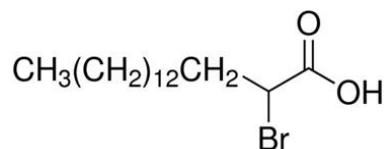


Figura 5. Estructura química del 2-Bromopalmitato.

La S-palmitoilación determina el funcionamiento de algunas proteínas al afectar a las membranas biológicas, la compartimentación en sus dominios y su estabilidad (Sobocińska et al., 2018). A su vez, también afectan a la interacción y a la señal de transducción de estas. Es por ello que cumple un papel crucial en la respuesta inmune innata, ya que está presente en vías de respuesta a infecciones como: cGAS-STING, IFN tipo I e IFITM (**Figura 6**) (Lee y Zheng, 2021).

La detección de RNA citosólico está mediada, principalmente, por el gen inducible por ácido retinoico I (RIG-I). RIG-I es un receptor de reconocimiento de patógenos (PRR) bien conservado para el reconocimiento de RNA viral, y activa vías de señalización a través de la señalización antiviral mitocondrial (MAVS). La estimulación de MAVS conduce a la activación de la quinasa de unión TANK-1 (TBK1), la cual fosforila IRF3 e IRF7 (Ablasser y Hur, 2019).

La GMP-AMP cíclico (cGAMP) sintasa (cGAS) se caracteriza por ser un PRR esencial para la detección de DNA citoplasmático. Al reconocer DNA exógeno y/o endógeno anómalo, cGAS produce cGAMP que activa al estimulador de genes de interferón (STING). STING promueve la activación de IRF3, dando lugar a la producción de

IFN-I. La palmitoilación de STING favorece la translocación al núcleo de IRF3, promoviendo la vía de señalización de IFN-I. El IFN-I se une a los receptores de membrana, IFNAR1 e IFNAR2, involucrados en la vía de señalización JAK-STAT. Para llevar a cabo la fosforilación y translocación al núcleo de las proteínas dimerizadas STAT, es necesaria la palmitoilación de IFNAR1 (Lee y Zheng, 2021).

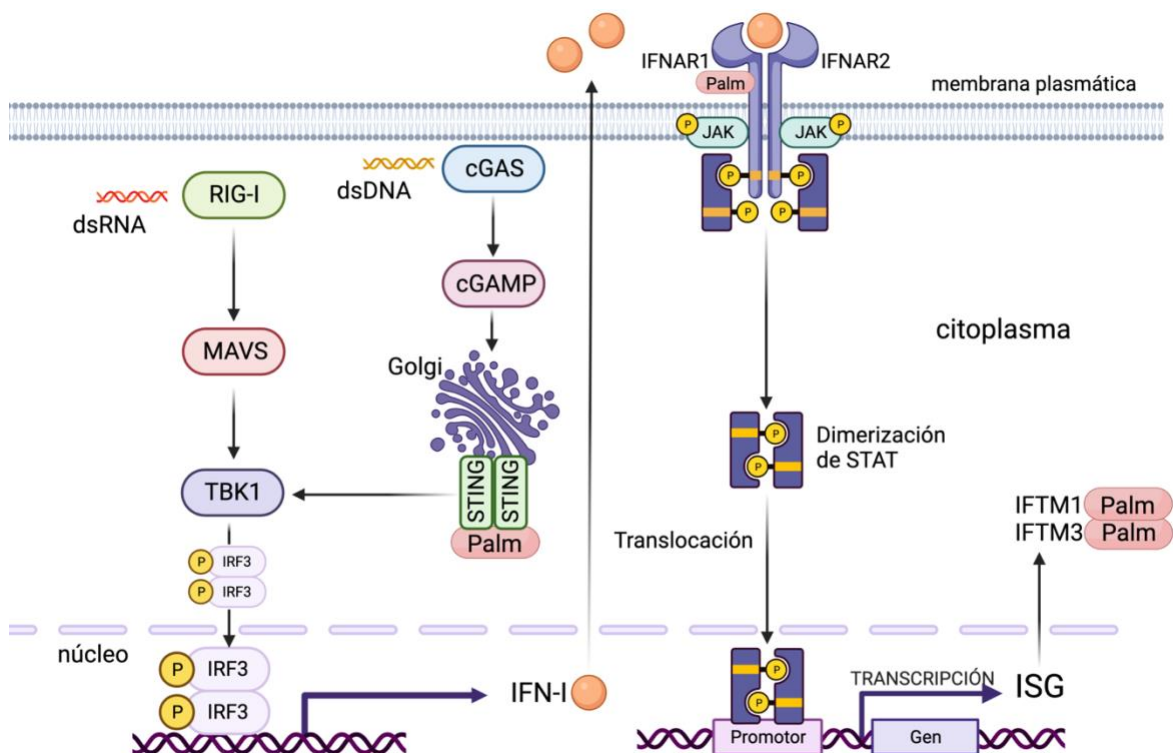


Figura 6. Mecanismos de S-palmitoilación en la vía de señalización de la respuesta inmune innata frente a virus. P=fostato, Palm=palmitoilación. Imagen modificada de (Lee y Zheng, 2021) y realizada en Biorender.com

En la vía de las IFITM, se ha observado que la palmitoilación de IFITM1 en modelos murinos aumenta la capacidad antiviral contra virus como la gripe A (Lee y Zheng, 2021). En el caso de IFITM3, su palmitoilación bloquea la fusión de la membrana del virus con la del endosoma y, por tanto, la entrada del genoma viral al citoplasma de la célula (McMichael et al., 2017).

Los virus requieren de la maquinaria del huésped para realizar las modificaciones postraduccionales de las proteínas esenciales necesarias para infectar y replicar su genoma. Las proteínas palmitoiladas virales más estudiadas son las proteínas de membrana de los virus con envoltura, virus que han adquirido una bicapa lipídica durante su replicación en la célula huésped. La envoltura es rica en glicoproteínas

transmembrana, frecuentemente S-palmitoiladas, que permiten: la unión a receptores afines de la célula diana, desencadenar la endocitosis del virión y favorecer su salida al exterior una vez llevada a cabo la replicación (Sobocińska et al., 2018).

1.4 Virus de pez empleados en este trabajo

Como hemos mencionado anteriormente, la familia Rhabdoviridae es una de las familias con mayor impacto en la producción acuícola, ya que engloba uno de los grupos más numerosos de virus que causan enfermedades en peces teleósteos (Frerichs et al., 1989). Esta familia posee un genoma de RNA monocatenario de polaridad negativa (ssRNA -) y una morfología característica en forma de bala (Riedel et al., 2020) (**Figura 7**).

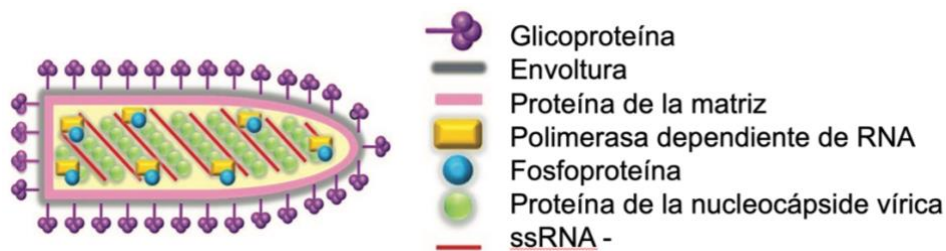


Figura 7. Estructura del virión de la familia Rhabdoviridae. Imagen modificada de (Ashraf et al., 2016).

1.4.1 Virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV)

El VHSV pertenece al género Novirhabdovirus y se trata de un virus con envoltura de 80 nm de alto por 170 nm de largo. El ssRNA tiene alrededor de 11Kb y contiene seis genes estructurales en sentido 3'-5': la proteína de la nucleocápside vírica (N), la fosfoproteína (P), la proteína de la matriz (M), la glicoproteína (G), la proteína no viriónica (NV) y, por último, la polimerasa dependiente de RNA (L). La proteína G es la única glicoproteína de superficie y, por tanto, el factor esencial para la adhesión y entrada del virus, incluida la fusión de ambas membranas (Einer-Jensen et al., 2004).

Las secuencias de nucleótidos del gen G se han utilizado para clasificar las cepas de VHSV en cuatro genotipos principales y nueve subtipos con distribuciones geográficas casi distintas. La gama de hospedadores y la patogenicidad parecen estar vinculadas, en cierta medida, al genotipo de VHSV (World Organisation for Animal Health, 2021).

El VHSV causa la enfermedad de la septicemia hemorrágica viral en peces de agua dulce y salada, siendo la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) la especie más vulnerable a la infección (Munro y Gregory, 2010). La infección por VHSV puede causar mortalidad en todas las etapas de la vida de los peces susceptibles, pudiendo llegar al 100% en alevines (Meier et al., 1994).

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad pueden ser inespecíficas. Estas incluyen: oscurecimiento de la piel, letargia, exoftalmia, empaldecimiento de las branquias, hemorragias y natación anómala (**Figura 8**). La transmisión se produce de manera horizontal a través del agua mediante la excreción de orina y fluidos reproductivos de los peces infectados (De Kinkelin, 1979).



Figura 8. Infección en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con VHSV. Imagen tomada en el laboratorio de Estrategias Antivirales (IDiBE-UMH).

1.4.2 Virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV)

El SVCV pertenece al género *Sprivirus* y tiene un tamaño de 60-90 nm de ancho por 80-180 de largo. Al igual que VHSV, posee un genoma de unas 11Kb y los genes se disponen de la misma manera. Sin embargo, SVCV no dispone del gen NV entre los genes estructurales G y L, como ocurre con otros *Rhabdovirus* (Ashraf et al., 2016).

La enfermedad causada por el SVCV está catalogada como una de las enfermedades más importantes de peces según la Organización Mundial de la Sanidad Animal. El principal hospedador del SVCV es la carpa común (*Cyprinus carpio*), aunque se ha

visto que también puede infectar otros Ciprínidos (World Organisation for Animal Health, 2021).

En general, los peces juveniles de hasta 1 año de edad son los más susceptibles a la enfermedad clínica, pero todos los grupos de edad pueden verse afectados. Además del estado fisiológico de los peces, el estado de la inmunidad innata en función de la edad parece ser un factor también determinante, cuanto más joven es el pez mayor susceptibilidad a la enfermedad (World Organisation for Animal Health, 2021).

El virus entra al huésped a través de las branquias, se propaga por la sangre y llega rápidamente a hígado, riñón, bazo y tracto digestivo. Se elimina vía orina y heces.

El modo de transmisión es vía horizontal, y esta puede ser directa o vectorial, siendo el agua el principal medio de propagación. Una vez el virus se ha establecido en los estanques de producción acuícola puede resultar difícil erradicarlo (Kanellos et al., 2006).

La sintomatología clínica es inespecífica, aunque los signos más comunes suelen ser: exoftalmia, distensión abdominal, inflamación o edema del conducto de ventilación y hemorragias (**Figura 9**) (World Organisation for Animal Health, 2021).



Figura 9. Infección de pez cebra (*Danio rerio*) con SVCV. Imagen tomada en el laboratorio de Estrategias Antivirales (IDiBE-UMH).

1.5 ANTECEDENTES

La motivación de este TFM se basa en investigaciones previas llevadas a cabo en nuestro laboratorio. En el año 2021, se estudiaron los efectos de los antitumorales 5-FU y VTPF sobre células de pez cebra (ZF4) infectadas con SVCV. El pretratamiento con VTPF en la línea celular ZF4 parecía inhibir la replicación de SVCV y los niveles de expresión de *ifitm1*, *ifitm5* e *isg15* (Talavera et al., 2021). Posteriormente, al año siguiente, se investigó el efecto de la VTPF sobre células de EPC contra SVCV y su papel en genes relacionados con la respuesta inmune innata. Se observó que el tratamiento con VTPF: protegía durante la infección con SVCV, inhibía su replicación viral y estimulaba la expresión de genes de la respuesta inmune innata (*ifitm1*, *irf3* e *isg15*) (Gómez-Quintanilla et al., 2022).

En el caso del 2-BP, se había estudiado su efecto sobre SVCV: se observó una disminución de la síntesis de RNA viral de SVCV, pero un aumento notable de la fusión de membranas inducida por el virus (García et al., 2022).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es utilizar compuestos que modulan la respuesta inmunitaria mediada por IFN, VTPF y 2-BP, para observar cómo influyen en la respuesta celular a la infección con dos modelos de virus de pez, el virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV) y el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV). Los objetivos para llevar a cabo esta investigación fueron:

- ❖ Evaluar el efecto de VTPF y 2-BP sobre la infectividad de SVCV y VHSV en células EPC.
- ❖ Evaluar el efecto de VTPF y 2-BP en células EPC inmunoestimuladas con poly I:C y por la infección persistente con IPNV (EPC^{IPNV}).
- ❖ Evaluar el efecto de VTPF y 2-BP sobre la expresión de genes relacionados con la vía de IFN (*irf3*, *mx* y *sting*) en células EPC.
- ❖ Observar el efecto de poly I:C, VTPF y 2-BP sobre la expresión de los genes *irf3*, *mx* y *sting* en células EPC^{IPNV}.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Líneas celulares

En este trabajo se ha empleado la línea celular Epithelioma Papulosum Cyprini (EPC), que son células epiteliales pertenecientes a la especie *Pimephales promelas*, un pez de la familia Cyprinidae. La línea se adquirió de la Colección Europea de Cultivos Celulares (identificación ECACC nº 93120820). El mantenimiento de las células se llevó a cabo en botes de cultivo de 25 cm² en medio RPMI 10% a una temperatura de 21°C.

Para el establecimiento de la línea celular EPC^{IPNV} se siguió el procedimiento descrito en (García et al., 2011), se infectaron células EPC con la cepa IPNVSp. El mantenimiento de las células se llevó a cabo en botes de cultivo de 25 cm² en medio RPMI 10% a una temperatura de 21°C.

Para el subcultivo de células EPC y EPC^{IPNV}, se usó la solución Tryple Select (Gibco) para disociar las células del anclaje del material plástico, y medio de cultivo al volumen necesario para sembrar las placas o frascos nuevos a una temperatura de 21°C.

3.2 Medios de cultivo

Para el crecimiento y mantenimiento de las células EPC, se usó el medio de cultivo RPMI- 1640 Dutch con 20 mM HEPES (Gibco BRL-Invitrogen), 2% o 10% de suero fetal bovino (SFB, Linus-Cultek), 2 mM de glutamina (Gibco BRL), 1 mM de piruvato sódico (Gibco BRL), y antibióticos (1,2 µg/ml de anfotericina B y 50 µg/ml de gentamicina) (Gibco BRL). Dependiendo del porcentaje de suero fetal bovino en disolución, se nombra RPMI 2% o RPMI 10%.

3.3 Virus

3.3.1 Virus de la Viremia Primaveral de la Carpa (SVCV)

Se usaron las cepas Fijan de SVCV aislada de carpa. Las infecciones con SVCV se mantuvieron a 21°C en medio RPMI 2%.

3.3.2 Virus de la Septicemia Hemorrágica viral (VHSV)

Se usó la cepa 07.71 de VHSV aislada de trucha arcoíris. Las infecciones con VHSV se mantuvieron a 14°C en medio RPMI 2%.

3.4 Compuestos

3.4.1 Verteporfina

La VTPF fue proporcionada por el Servicio de Farmacia del Hospital General Universitario de Elche.

La solución stock de VTPF se preparó realizando diluciones de trabajo de 10 μM y 100 μM en tampón fosfato salino (PBS) estéril. Los experimentos se realizaron a una concentración de 1 μM en medio RPMI 2%.

3.4.2 2- Bromopalmitato

El 2-Bromopalmitato o ácido 2-Bromohexadecanoico (Sigma-Aldrich, USA) fue diluido en etanol absoluto a una concentración de 3mg/mL para su uso como stock. Los experimentos se realizaron a una concentración de 25 μM en medio RPMI 2%.

3.5 Ensayo de supervivencia celular

Las células EPC o EPC^{IPNV} se sembraron en placas de 96 pocillos en medio RPMI 10%. Tras alcanzar una confluencia del 100%, se añadieron los compuestos VTPF (1 μM) y 2-BP (25 μM) diluidos en medio RPMI 2%. Las infecciones con SVCV o VHSV se realizaron a una $\text{moi}=0,02$ virus/célula para evaluar el efecto o el grado de protección frente a los virus. Transcurrido el tiempo estimado para cada experimento se tiñeron las placas con Giemsa (5mg/mL) o Cristal Violeta (1% peso/volumen), según el grado de toxicidad. Por último, para determinar la supervivencia celular se midió la absorbancia a 570 nm en espectrofotómetro Eon Biotek (BioTek Instruments, Inc.).

3.6 Ensayo de formación de calvas

Se sembró una placa de 24 pocillos con células EPC. Posteriormente, y una vez alcanzada una confluencia del 100%, se añadió poly I:C (20 µg/mL) y VTPF (1 µM); y se dejaron actuar durante 18 horas. Transcurrido ese tiempo se procedió a la infección de la placa con SVCV (50 virus/pocillo) durante 1 hora. A continuación, se retiró el medio y se añadió 600 µL/pocillo de metilcelulosa al 75% (8mg/mL en medio RPMI 2% pH=7). Las células se dejaron incubar hasta la formación de calvas (5dpi) y se tiñeron con Cristal Violeta durante 1 hora para su visualización.

3.7 Evaluación del efecto de VTPF y 2-BP en EPC y EPC^{IPNV}

Para evaluar el efecto de los compuestos se sembraron células EPC y EPC^{IPNV} en placa de 4, 24 o 96 pocillos. Tras alcanzar una confluencia del 100% se añadieron VTPF (1 µM), 2-BP (25 µM) y poly I:C (20 µg/mL) diluidos en medio RPMI 2% dejándolos actuar durante 24 horas. Según el experimento las muestras se recogieron a distintos tiempos en buffer de lisis TRK para su procesamiento y análisis mediante RT-qPCR.

3.8 Ensayo de PCR cuantitativa

Las muestras celulares se recogieron en 350 µL de buffer de lisis TRK. A continuación, se realizó la extracción de RNA con el kit E.Z.N.A Total RNA OMEGA BioTek (Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, GA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, se cuantificó el RNA extraído mediante un espectrofotómetro Nanodrop (Nanodrop Technologies).

Seguidamente, se realizó la transcripción inversa (RT). Por cada 300ng de RNA se agregó 1 µL de mezcla de dNTPs [10 mM] y 0,5 µL de cebadores *Random Hexamers*. La desnaturalización de RNA se llevó a cabo durante 5 minutos a una temperatura de 65°C. A continuación, después de dejar reposar las muestras en hielo durante 1 minuto, se agregaron a cada muestra 4 µL de *First Strand Buffer RT 5X*, 2 µL de *DTT*, 0,5 µL de *HP-RnaseInhibitor*, 0,5 µL de *MMLV-RT*, obteniendo un total de 20 µL de volumen en cada tubo. La reacción se llevó a cabo en un termociclador *Applied Biosystems 2700* a 25°C x 10 minutos, 37°C x 50 minutos y 70°C x 15 minutos.

Finalmente, la PCR cuantitativa se realizó en un volumen de 20 μL (2 μL de cDNA, 10 μL de SYBR Green Universal PCR Master Mix Applied Biosystems y los primers necesarios para cada gen (**Tabla 1**) en un termociclador Applied Biosystems 2700 mediante el programa: 50°C durante 2 minutos seguido de una desnaturalización inicial de 95°C durante 10 minutos; 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 1 minuto a 60°C. El nivel de expresión de los genes celulares *irf3*, *mx*, *sting*, *ifitm1*, *ifitm5*, y del segmento A del virus IPNV (*ipnv-a*) se normalizaron respecto a *eF1 α* (Factor de elongación de la traducción 1-alfa) considerado como control endógeno. Los valores de expresión relativa de cada gen se calcularon mediante el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Los resultados se han representado como la media \pm la desviación estándar (SD) de cada muestra por duplicado.

Tabla 1. Lista de primers

Gen	Primer Forward (5' - 3')	Primer Reverse (5' - 3')
<i>eF1α</i>	CTGGAGGCCAGCTCAAACAT	CATTTCCCTCCTTACGCTCAAC
<i>irf3</i>	GTTTAGAGGGACAATTAAGTGGACTA	GAGGGTCCACTCTTTGAAAATG
<i>mx</i>	GGTCTCTGGGAGTCGAAAAGG	AACTTTTCCCGAGCTITCGGT
<i>sting</i>	TTCTCTAGAGTGCCGGAACC	TCATTTGGTGGCTCTCGGAT
<i>ifitm1</i>	CTTCTGTAACCCATGCTGC	GTGACAGCAGCGATGATGAG
<i>ifitm5</i>	AGACAAGGCCGAAGTGGTACA	TTTGGTGGTGGGATTGCTTG
<i>ipnv-a</i>	TCTCCCGGGCAGTTCAAGT	CGGTTTCACGATGGGTTGTT

3.9 Análisis estadístico

Se usó el software Graphpad 9.5.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) para el análisis estadístico. Se utilizó la prueba *t de Student* de datos independiente para calcular las diferencias de las medias de los grupos experimentales con respecto al control. Se consideraron diferencias significativas (*) cuando el p-valor < 0,05.

4. RESULTADOS

4.1 Toxicidad de VTPF y 2-BP en células EPC

En primer lugar, se evaluó la toxicidad del compuesto VTPF usando la línea celular de carpa EPC. Se realizó un ensayo con el fin de observar la dosis-respuesta de la VTPF. Para ello se sembró una placa de 96 pocillos con células EPC. Se aplicaron concentraciones crecientes de VTPF para evaluar su efecto citotóxico.

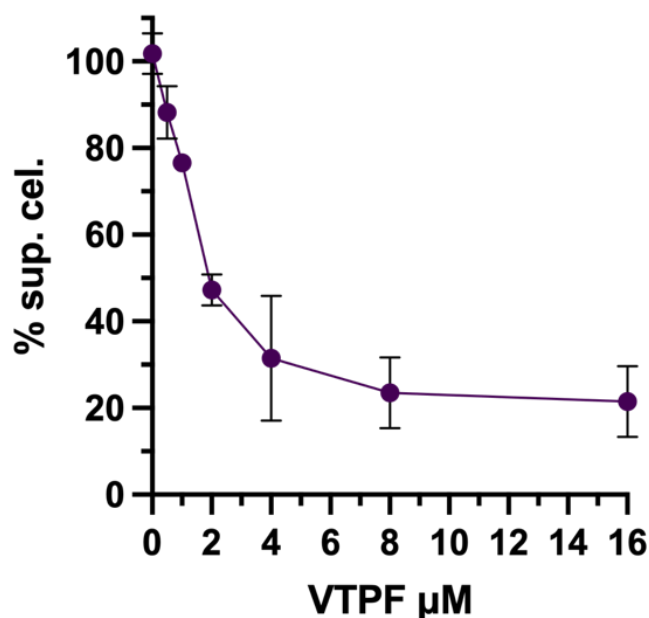


Figura 10. Evaluación de la toxicidad de VTPF a concentraciones crecientes sobre células EPC. Curva de citotoxicidad tras 48 horas de exposición al compuesto. Cada punto representa la media del triplicado con su correspondiente desviación estándar. El promedio del triplicado control sin compuesto se consideró como el 100% de referencia.

Los resultados muestran una disminución de la supervivencia celular a partir de 2 μM (**Figura 10**), observándose que a partir de esa concentración VTPF es tóxica. A partir de este experimento se decidió usar la concentración de 1 μM para los posteriores ensayos.

En el caso de 2-BP, la toxicidad del compuesto se tomó a partir de los resultados obtenidos en un trabajo previo en el laboratorio, donde se comprobó que el 2-BP era tóxico a partir de 50 μM (García., et al 2022).

4.2 Efecto de los compuestos durante la infección viral

Para evaluar los efectos tanto de VTPF como de 2-BP durante la infección vírica, se determinó el uso de dos modelos de virus de pez (SVCV y VHSV), ya que las células EPC son susceptibles a ambos.

4.2.1. Efecto de VTPF y 2-BP durante la infección con VHSV

Las células EPC cultivadas en placa se infectaron con VHSV junto con los tratamientos VTPF y 2-BP a distintos tiempos para comprobar el efecto de los compuestos durante el desarrollo de la infección.

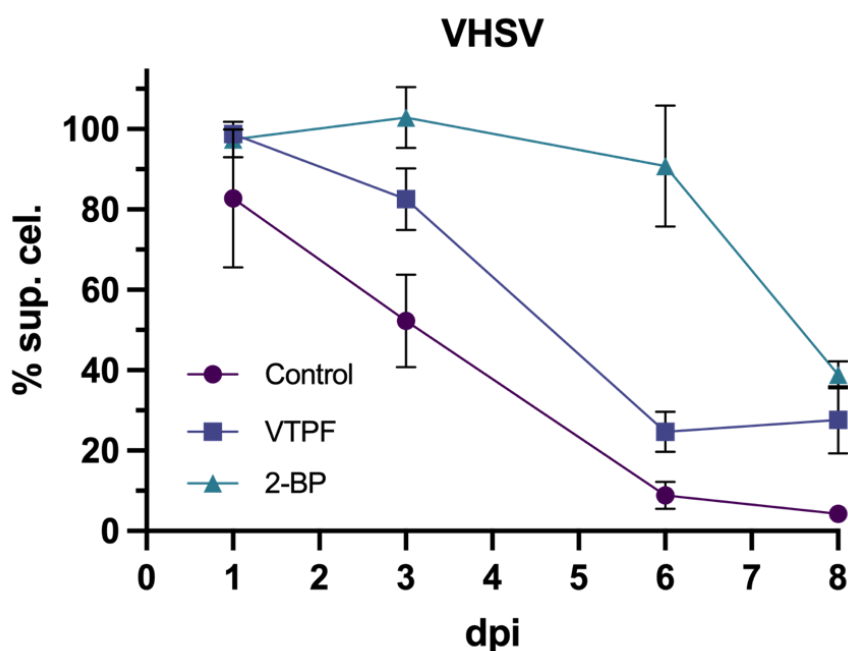


Figura 11. Cinética de infección con VHSV ($\text{moi}=0,02$ virus/célula) junto con los tratamientos VTPF ($1\mu\text{M}$) y 2-BP ($25\mu\text{M}$) sobre células EPC. Cada punto representa la media del triplicado con su correspondiente desviación estándar. El promedio del triplicado control no infectado se consideró como el 100% de referencia.

Los resultados revelan que VTPF apenas reduce la muerte celular provocado por la infección con VHSV, mientras que 2-BP proporciona una buena protección durante los primeros 6 días, ya que la supervivencia celular se mantuvo al 85% en comparación con el control de infección, que se redujo hasta el 10% (**Figura 11**).

4.2.2. Efecto de VTPF y 2-BP durante la infección con SVCV

Al igual que en el experimento anterior, se quiso comprobar el efecto de los tratamientos durante el desarrollo de la infección con SVCV.

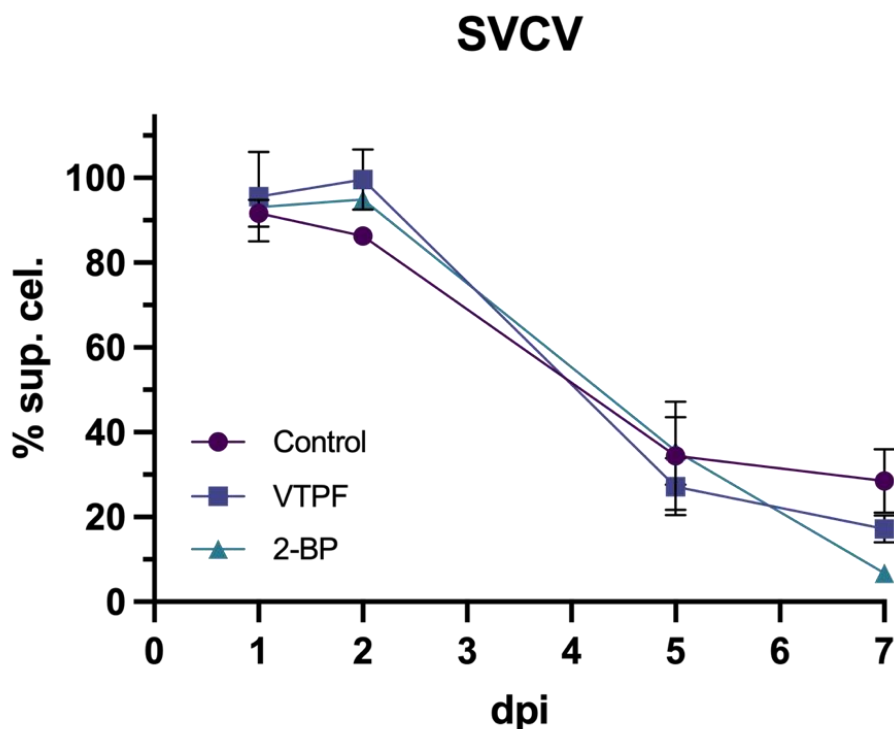


Figura 12. Cinética de infección con SVCV ($\text{moi}=0,02$ virus/célula) junto con los tratamientos VTPF ($1\mu\text{M}$) y 2-BP ($25\mu\text{M}$) sobre células EPC. Cada punto representa la media del triplicado con su correspondiente desviación estándar. El promedio del triplicado control no infectado se consideró como el 100% de referencia.

En las células EPC infectadas con SVCV ninguno de los tratamientos protegió durante la infección con SVCV, dado que a lo largo de los días existe una caída de la supervivencia celular, tanto en el control de infección como con los tratamientos (**Figura 12**).

Tras los resultados obtenidos en las cinéticas de SVCV y VHSV, se decidieron realizar experimentos con los compuestos 24 horas antes de la infección.

4.3 Efecto de los compuestos 24 horas antes de la infección viral

Con el objetivo de observar si VTPF y 2-BP funcionan como pretratamientos e inhiben la replicación de los virus en las células EPC, se realizaron ensayos de supervivencia celular en los que se añadieron los compuestos 24 horas antes de la infección.

4.3.1. Efecto de VTPF y 2-BP como pretratamientos en la infección de VHSV

Para demostrar los efectos de los pretratamientos se sembró una placa de 96 pocillos con células EPC. Posteriormente, se añadieron VTPF y 2-BP; y pasadas 24 horas se retiraron los compuestos y se infectaron las células con VHSV.

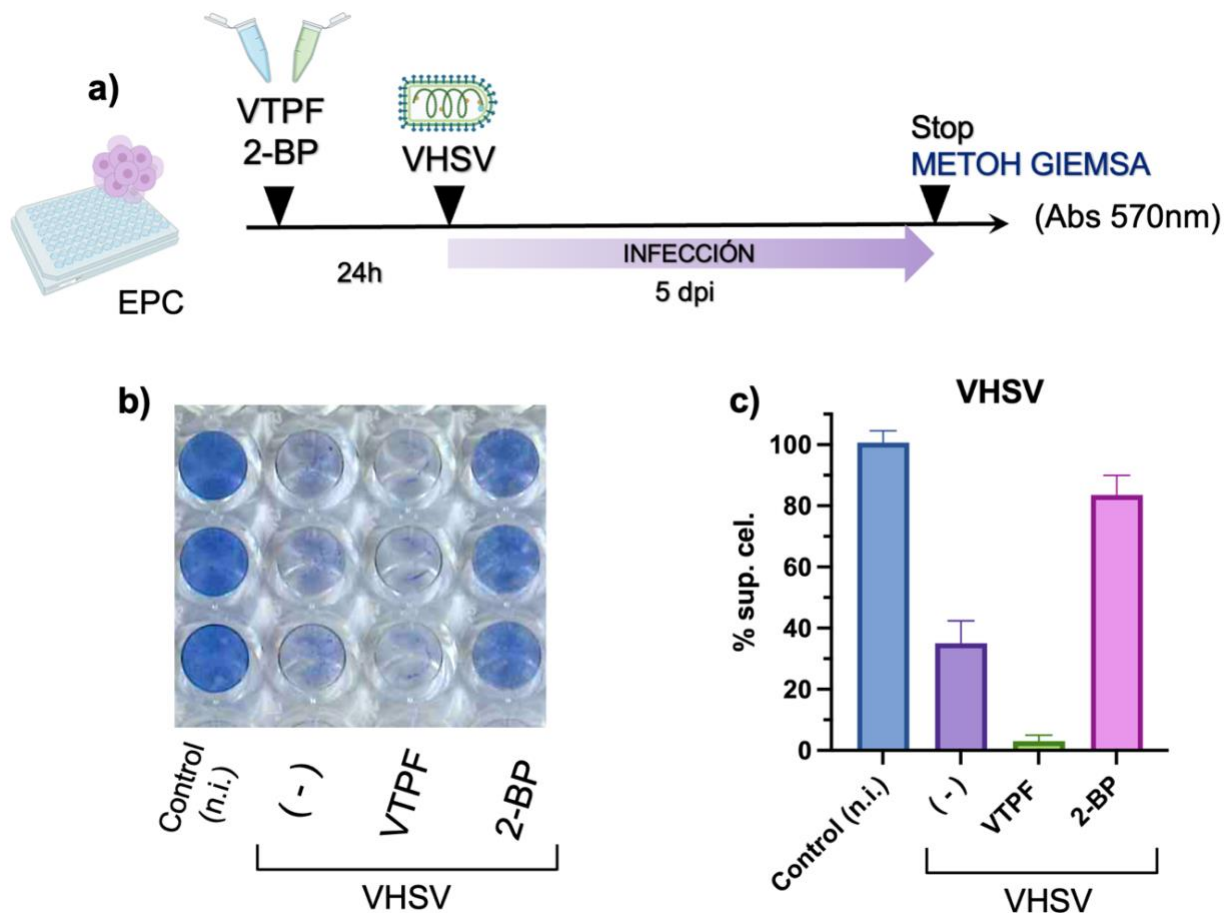


Figura 13. Evaluación del efecto de VTPF (1 μ M) y 2-BP (25 μ M) durante 24h sobre la infección de VHSV (moi=0,02 virus/célula) en células EPC. **a)** Diseño experimental. **b)** Imagen de la placa teñida con Giemsa. **c)** Supervivencia celular, cada barra representa la media del triplicado con su correspondiente desviación estándar. El promedio del triplicado control no infectado se consideró como el 100% de referencia.

El resultado indica que las células pretratadas con 2-BP mantienen la supervivencia celular entorno al 80% tras 5 días de infección, mientras que en las pretratadas con VTPF parece aumentar el efecto citopático, lo que indicaría una mayor replicación de VHSV (**Figura 13**).

4.3.2. Efecto de VTPF y 2-BP como pretratamientos en la infección de SVCV

Se efectuó el mismo protocolo, esta vez infectando las células EPC con SVCV.

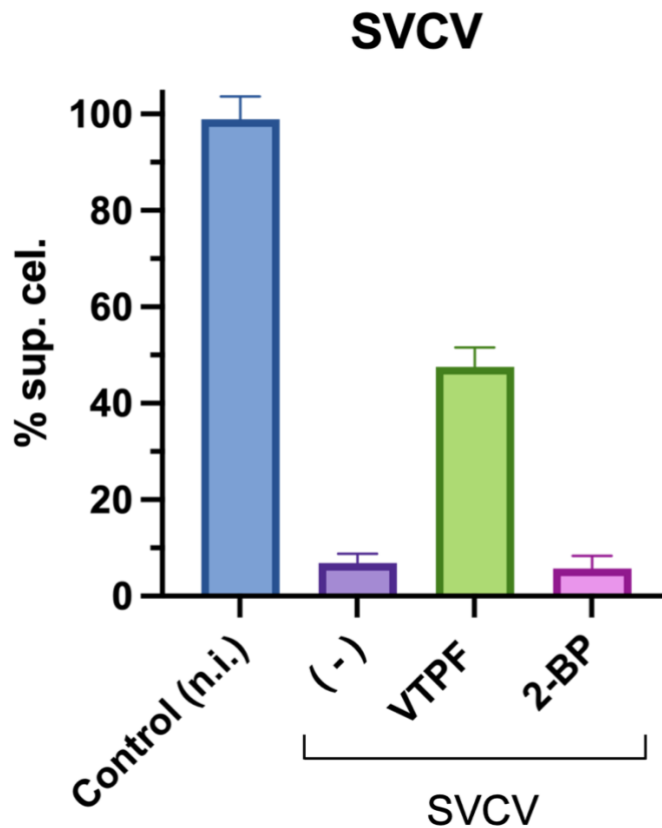


Figura 14. Evaluación del efecto de VTPF (1 μ M) y 2-BP (25 μ M) durante las 24 horas previas a la infección con SVCV (moi=0,02 virus/célula) (3 dpi) en células EPC. Cada barra representa la media del triplicado con su correspondiente desviación estándar. El promedio del triplicado control no infectado se consideró como el 100% de referencia.

En el caso de SVCV, el pretratamiento con VTPF protegió un 50% con respecto al control de infección, mientras que el 2-BP no ofrece protección frente al virus (**Figura 14**).

Se decidió verificar el resultado anterior de VTPF mediante un ensayo de formación de calvas. La infección de las células por SVCV en un medio denso semisólido que limita la infección a células adyacentes. Una vez teñida la placa somos capaces de visualizar las calvas a simple vista. En este experimento se empleó la molécula poly I:C. El poly I:C es un análogo sintético del RNA de doble cadena que activa la ruta del interferón, por lo que se debería observar una inhibición de la replicación viral; lo que conllevaría una disminución en el número de calvas.

Para llevar a cabo el experimento se sembró una placa con células EPC. Posteriormente, se añadieron poly I:C y VTPF, tanto conjuntamente, como por separado y se dejaron actuar durante 18 horas. Transcurrido ese tiempo se procedió a la infección de toda la placa con SVCV (50 virus/pocillo).

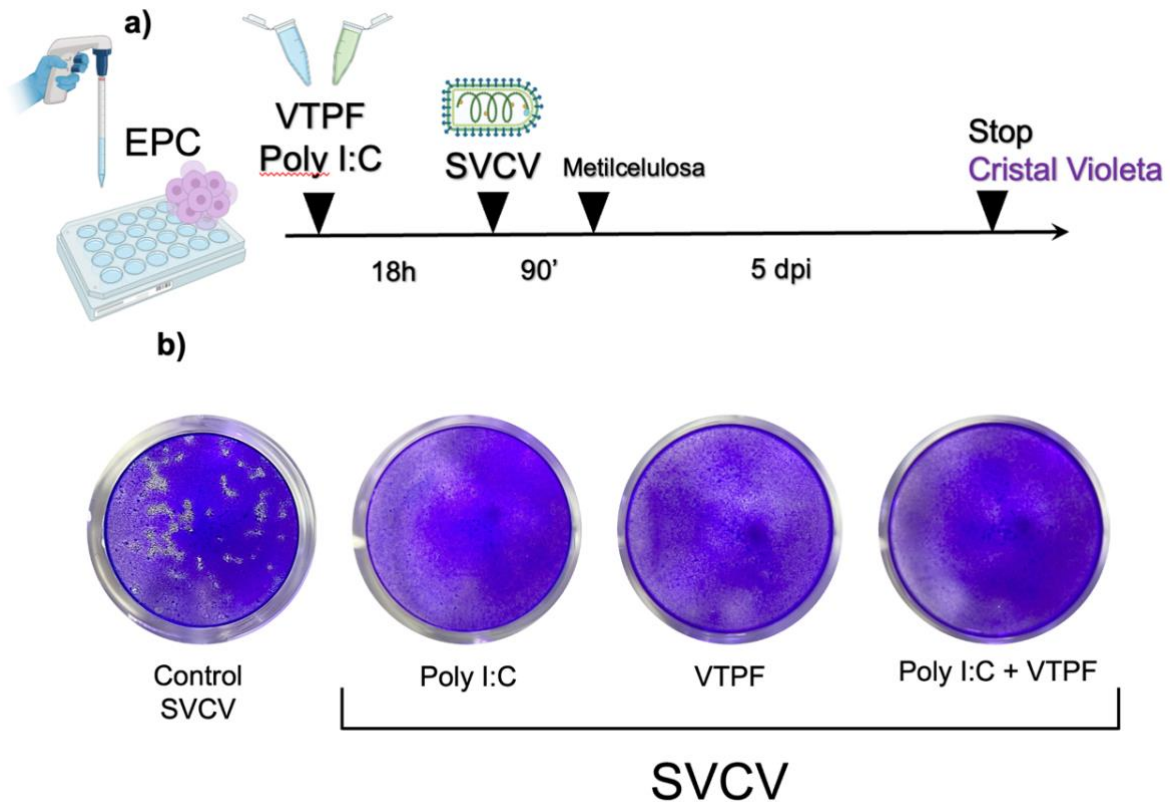


Figura 15. Evaluación del efecto de VTPF ($1\mu\text{M}$) y poly I:C ($20\mu\text{g/mL}$) durante las 18 horas previas a la infección sobre la formación de calvas de SVCV (50 virus/pocillo) en células EPC. **a)** Diseño experimental. **b)** Imagen de la placa en lupa binocular (1x).

El resultado obtenido muestra la formación de calvas únicamente en los pocillos infectados con SVCV sin pretratamientos, por lo que se puede observar que poly I:C y VTPF ofrecieron protección frente al virus tanto conjuntamente como por separado (**Figura 15**).

4.4 Efecto de VTPF y 2-BP sobre genes implicados en la respuesta inmune innata en EPC

El siguiente paso fue estudiar el efecto de los pretratamientos sobre genes implicados en la respuesta inmune innata (*irf3*, *mx* y *sting* (Ishikawa y Barber, 2008)), para comprobar si existía un aumento o una inhibición de la expresión relativa de los mismos. Se sembraron células EPC en placa de 96 pocillos y una vez alcanzada una

alta confluencia se añadió VTPF, 2-BP, y poly I:C como control de molécula inmunoestimuladora.

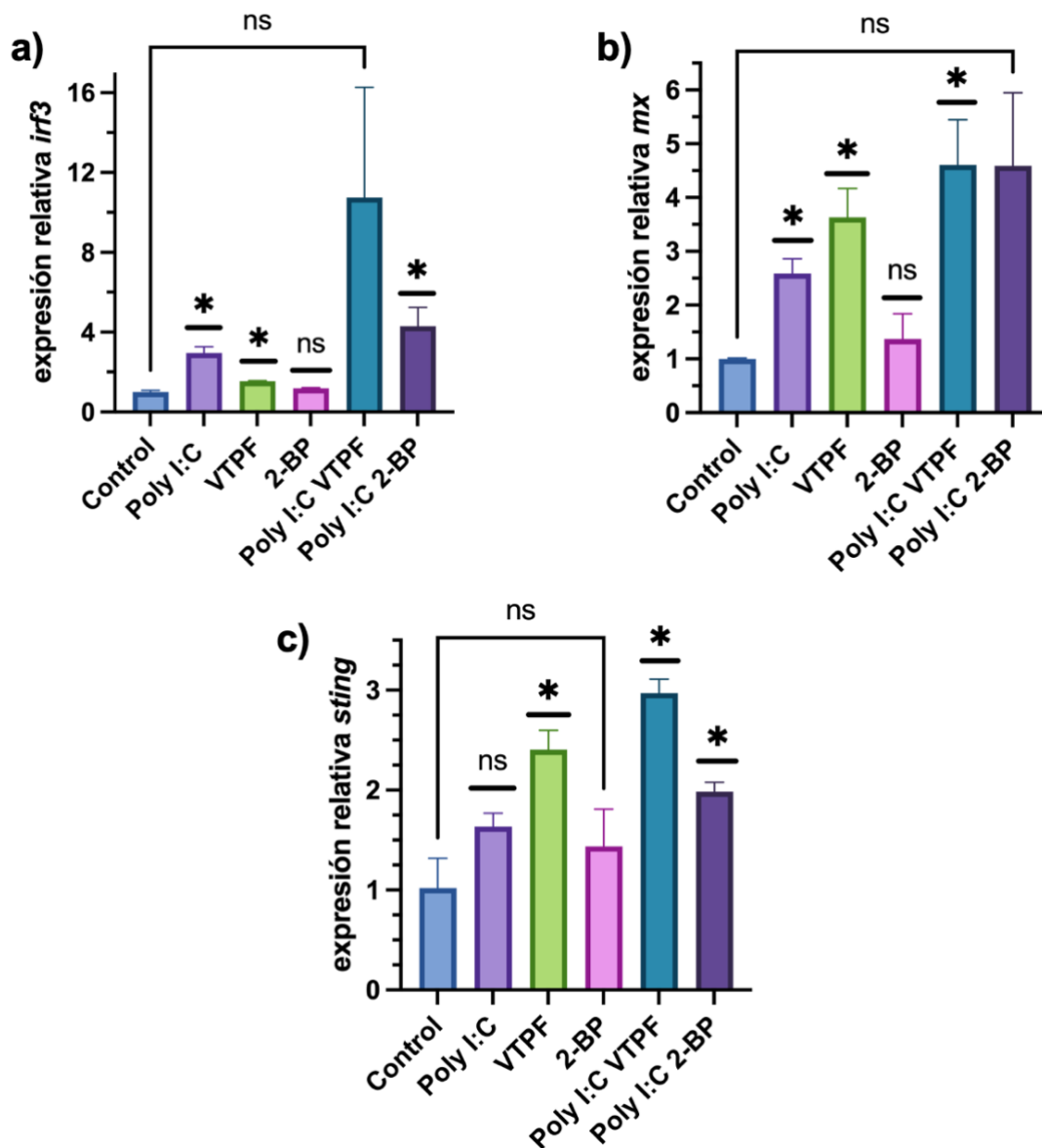


Figura 16. Cuantificación mediante RT-qPCR del efecto de poly I:C (20 μ g/mL), VTPF (1 μ M) y 2-BP (25 μ M) durante 24h en células EPC sobre la expresión de *irf3* (a), *mx* (b) y *sting* (c). Los resultados se expresan como niveles relativos al control de células no tratadas (=1). Cada barra representa el promedio del duplicado con su desviación estándar. * = P<0,05 y ns= no significativo.

En el caso del poly I:C , como era de esperar, produce un aumento de la expresión relativa de los 3 genes (**Figura 16**), aunque en el caso de *sting* este parece ser no significativo (**Figura 16c**). Por otro lado, la expresión relativa de todos los genes ha aumentado de manera significativa tanto con VTPF como con VTPF sumada a poly I:C (**Figura 16**). Sin embargo, el 2-BP no parece aumentar la expresión de ninguno de

los genes, pero acompañado de poly I:C se observa una pequeña estimulación que resulta estadísticamente significativa en el caso de *irf3* y *sting* (Figura 16a,c).

4.5 Efecto de los compuestos sobre células con respuesta inmune estimulada

El virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) puede establecer una infección persistente en células EPC, en el que una pequeña fracción de las células infectadas por IPNV se mantienen después de subcultivos continuos. Las EPC^{IPNV} son resistentes a la infección por IPNV y VHSV, ya que en estas células la respuesta inmunitaria innata está continuamente activada (Jurado et al., 2013).

4.5.1. Diferencias en la expresión de los genes de respuesta inmune entre las células EPC y EPC^{IPNV}

Para comprobar que existen diferencias entre las células EPC y EPC^{IPNV} en la expresión de genes implicados en la respuesta inmune innata, se evaluaron muestras mediante RT-qPCR en ambas células para medir los niveles de expresión de *irf3*, *mx* y *sting*.

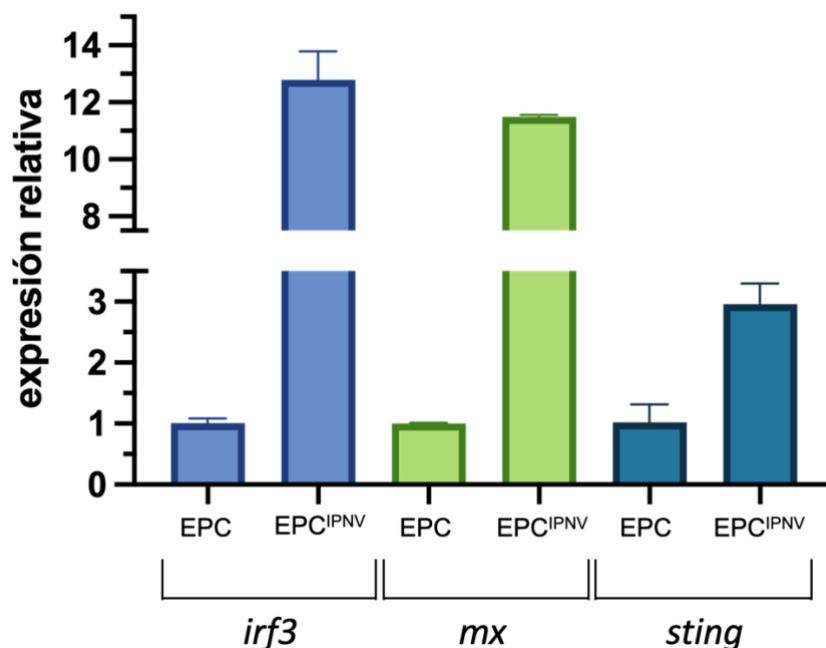


Figura 17. Cuantificación mediante RT-qPCR de la expresión de *irf3*, *mx* y *sting* en células EPC y EPC^{IPNV}. Los resultados se expresan como niveles relativos al control de células EPC (=1). Cada barra representa el promedio del duplicado con su desviación estándar.

Como se puede observar existe un incremento de los niveles de expresión de todos los genes en las células EPC^{IPNV} con respecto a las células EPC, sobre todo en los genes *irf3* y *mx*, en el que el nivel de expresión es 12 veces mayor. En el caso de *sting*, aunque su aumento es más moderado, este es 3 veces mayor en comparación al estado basal de las células EPC (**Figura 17**).

4.5.2. Efecto de VTPF y 2-BP sobre genes implicados en la respuesta inmunitaria innata en células EPC^{IPNV}

De la misma manera que se analizaron los efectos producidos por los pretratamientos durante 24 horas en los niveles de expresión de los genes implicados en la respuesta inmune innata, se quiso conocer los posibles efectos del uso de VTPF y 2-BP en las células persistentemente infectadas EPC^{IPNV}. Para ello, se llevó un tratamiento de 24 horas con los compuestos y recogida de muestras para determinar los niveles de expresión de los genes *irf3*, *mx* y *sting*.

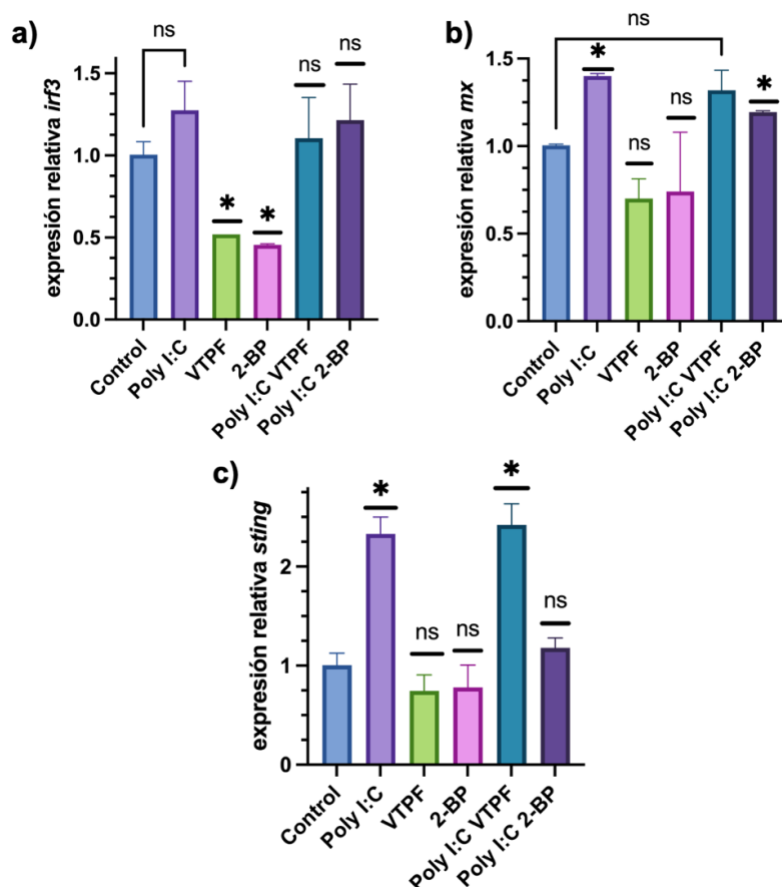


Figura 18. Cuantificación mediante RT-qPCR del efecto de poly I:C (20 μ g/mL), VTPF (1 μ M) y 2-BP (25 μ M) durante 24h en células EPC^{IPNV} sobre la expresión de *irf3* (a), *mx* (b) y *sting* (c). Los resultados se expresan como niveles relativos al control de células no tratadas (=1). Cada barra representa el promedio del duplicado con su desviación estándar. * = P<0,05 y ns= no significativo.

En cuanto a *irf3* parece existir una disminución significativa de la expresión relativa del gen con el uso de los pretratamientos VTPF y 2-BP, pero no con poly I:C (**Figura 18a**). Por otro lado, en el caso del gen *mx* existe una disminución modesta pero no significativa con la VTPF y un aumento estadísticamente significativo con el poly I:C (**Figura 18b**). Por último, la que muestra mayor variación es la expresión relativa de *sting*, aumenta con el tratamiento de poly I:C y de poly I:C combinado con VTPF (**Figura 18c**).

Obtenidos estos resultados, se quisieron estudiar los efectos de los compuestos como pretratamientos en otros genes que también implicados en la respuesta inmune innata (*ifitm1* y *ifitm5*), y comprobar si realmente existe una disminución del nivel de expresión en *mx*. Se sembró una placa con células EPC^{IPNV}, y una vez crecidas se añadieron VTPF y 2-BP dejándolos actuar 24 horas. Transcurrido ese tiempo se les cambió el medio y las muestras se recogieron 48 horas después.

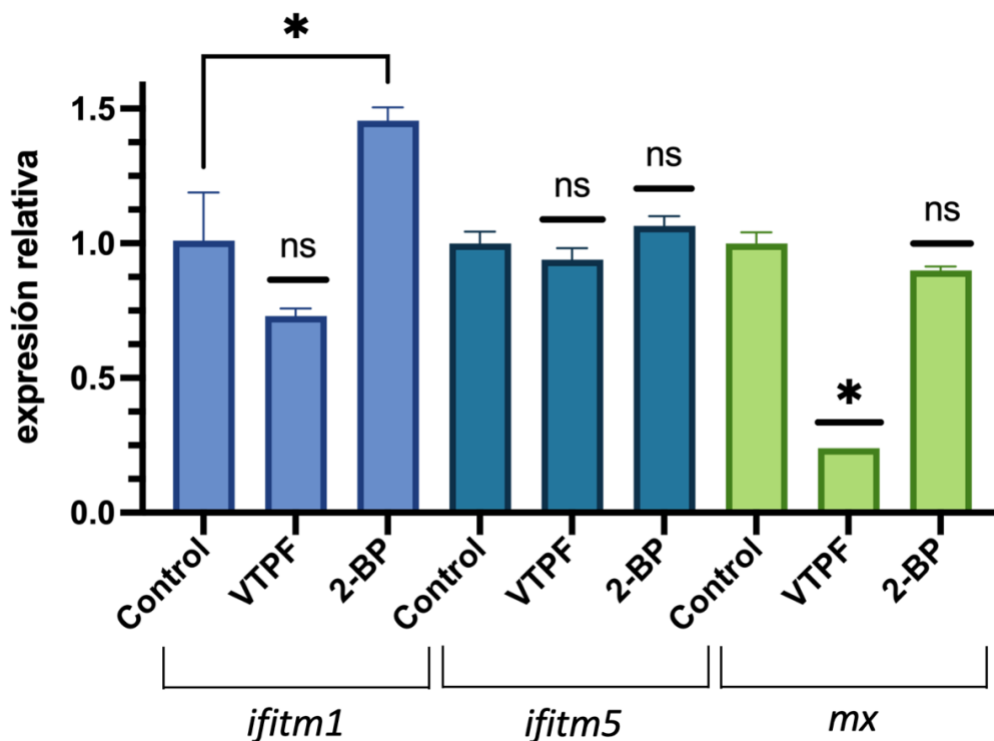


Figura 19. Cuantificación mediante RT-qPCR del efecto de VTPF (1 μ M) y 2-BP (25 μ M) durante 24h en células EPC^{IPNV} sobre la expresión de *ifitm1*, *ifitm5* y *mx*. Los resultados se expresan como niveles relativos al control de células no tratadas (=1). Cada barra representa el promedio del duplicado con su desviación estándar. * = P<0,05 y ns= no significativo.

El uso de 2-BP parece aumentar levemente los niveles de *ifitm1* de manera significativa, pero no altera los valores de *ifitm5* y *mx*. Por el contrario, la VTPF disminuye los niveles de expresión de *mx* un 75% con respecto al control no tratado, mientras que en el caso de *ifitm1* e *ifitm5* no existen diferencias significativas con respecto a los controles (**Figura 19**)

4.5.3. Efecto de VTPF y 2-BP en la síntesis de RNA de IPNV en células EPC^{IPNV}

Para observar si los compuestos alteraban el estado de infección persistente en las EPC^{IPNV} y si estos activaban a IPNV, se sembró una placa con células EPC^{IPNV}. Posteriormente se añadieron VTPF y 2-BP; y pasadas 24 horas se retiraron los compuestos. Transcurridas otras 48 horas las muestras fueron recogidas.

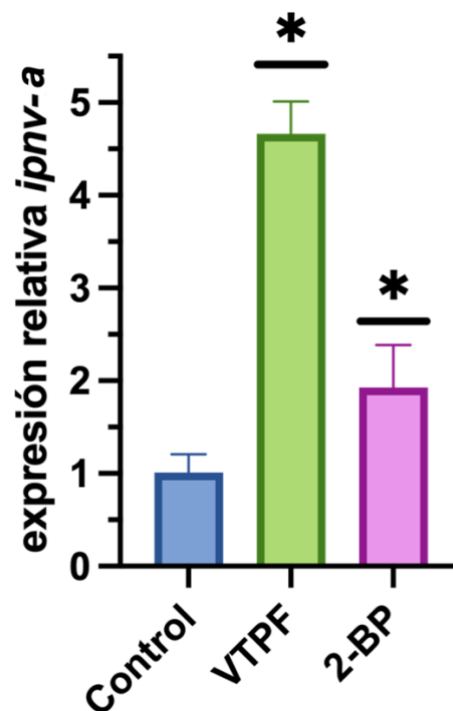


Figura 20. Cuantificación mediante RT-qPCR del efecto de VTPF (1 μ M) y 2-BP (25 μ M) durante 24h en células EPC^{IPNV} sobre la expresión de *ipnv-a*. Los resultados se expresan como niveles relativos al control de células no tratadas (=1). Cada barra representa el promedio del duplicado con su desviación estándar. * = P<0,05 y ns= no significativo.

Podemos ver que ambos pretratamientos aumentan el nivel de expresión de *ipnv-a*, muy notablemente con VTPF, el cual es 4 veces mayor con respecto al control. Por otro lado, el efecto del 2-BP parece ser mucho menos pronunciado, aunque significativo (**Figura 20**).

4.5.4. Efecto de VTPF y 2-BP en la expresión relativa de *ipnv-a* y *mx* en células EPC^{IPNV}

Tras el resultado anterior, se quiso comprobar el efecto de la VTPF y 2-BP a su vez en la expresión relativa del gen *mx* durante el tiempo. Para ello, se sembró una placa con EPC^{IPNV}. Se añadieron los compuestos y se dejaron actuar 1, 2 y 3 días en el caso de VTPF; y 1, 2, 3 y 4 días con 2-BP.

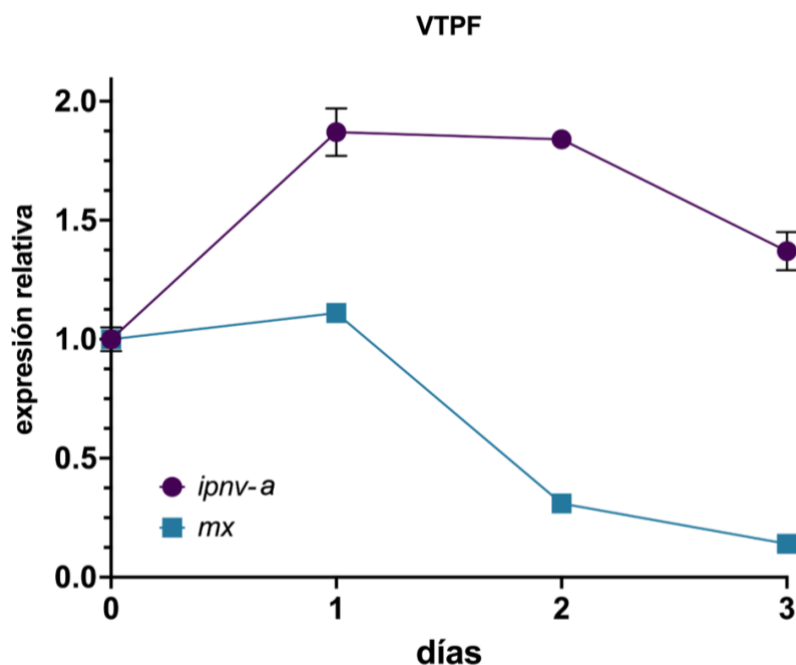


Figura 21. Cuantificación mediante RT-qPCR del efecto de VTPF (1 μM) en el tiempo sobre la expresión de *ipnv-a* y *mx* en células EPC^{IPNV}. Los resultados se expresan como niveles relativos al control sin tratamiento (=1).

Se produce un notable descenso de *mx* a los dos días de tratamiento, mientras que los niveles de *ipnv-a* se sitúan ya por encima del control desde el día 1 (**Figura 21**).

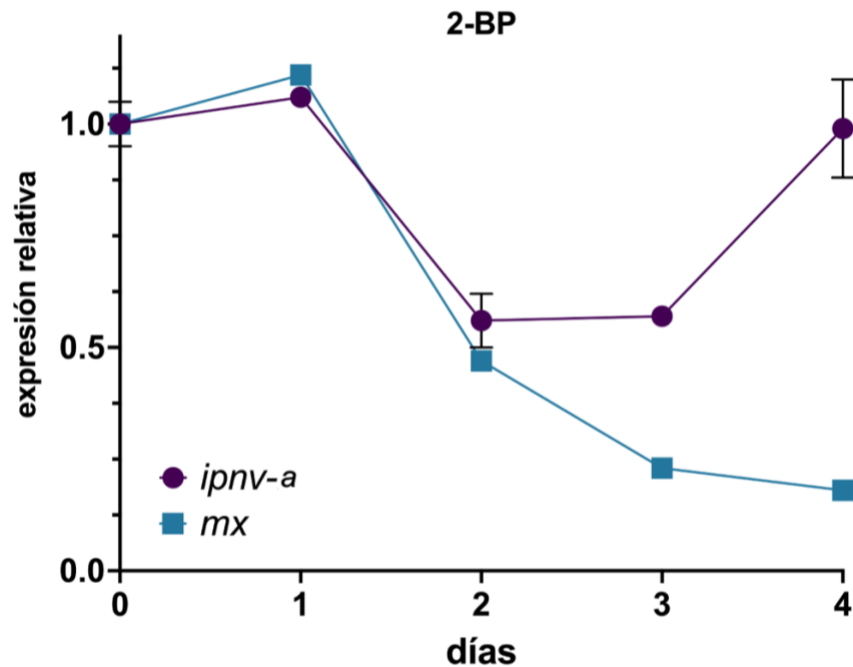


Figura 22. Cuantificación mediante RT-qPCR del efecto de 2-BP (25 μ M) en el tiempo sobre la expresión de *ipnv-a* y *mx* en células EPC^{IPNV}. Los resultados se expresan como niveles relativos al control sin tratamiento (=1).

En el caso de 2-BP, se observa una caída de los niveles de expresión de *mx* a partir del día 2. Los niveles de *ipnv-a* comienzan bajando, pero acaban incrementándose en el día 4 (**Figura 22**).

4.5.5. Efecto de los compuestos como pretratamientos frente a VHSV en células EPC^{IPNV}

Dado que las células EPC^{IPNV} deben ser resistentes a la infección con VHSV, quisimos comprobar si los pretratamientos de VTPF y 2-BP alteraban la resistencia de las células frente al virus. Para ello, se sembró una placa con células EPC^{IPNV}. Posteriormente, se añadieron VTPF y 2-BP; y pasadas 24 horas se infectaron las células con VHSV durante 5 días.

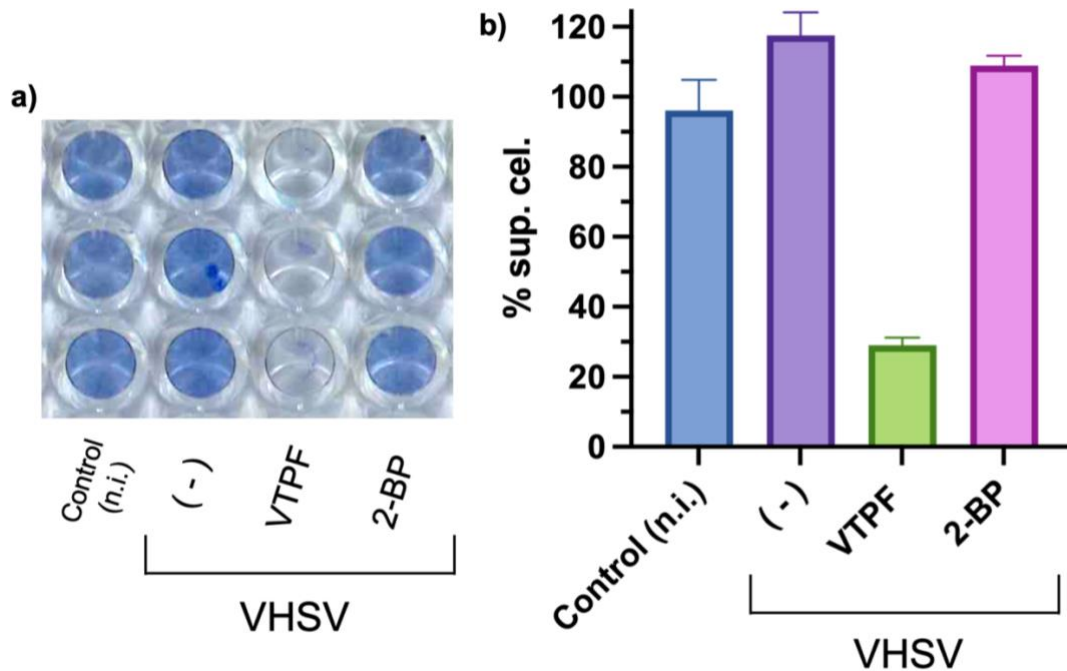


Figura 23. Evaluación del efecto de VTPF (1 μ M) y 2-BP (25 μ M) durante las 24 horas previas a la infección con VHSV (moi=0,02 virus/célula) en células EPC^{IPNV}. **a)** Imagen de la placa teñida con Giemsa. **b)** Supervivencia celular, cada barra representa la media del triplicado con su correspondiente desviación estándar. El promedio del triplicado control no infectado se consideró como el 100% de referencia.

Como podemos ver, las células infectadas con VHSV sin tratamientos mantienen el 100% de la supervivencia, al igual que las pretratadas con 2-BP, mientras que las que se les añadió VTPF muestran una reducción del 70% (**Figura 23**).

4.5.6. Efecto de VTPF y 2-BP durante la infección de VHSV en células EPC^{IPNV}

Al igual que se realizaron cinéticas de VHSV junto con VTPF y 2-BP en células EPC, se quiso averiguar qué ocurría en las EPC^{IPNV}. También se añadió un control de infección con células EPC para observar la diferencia entre ambas.

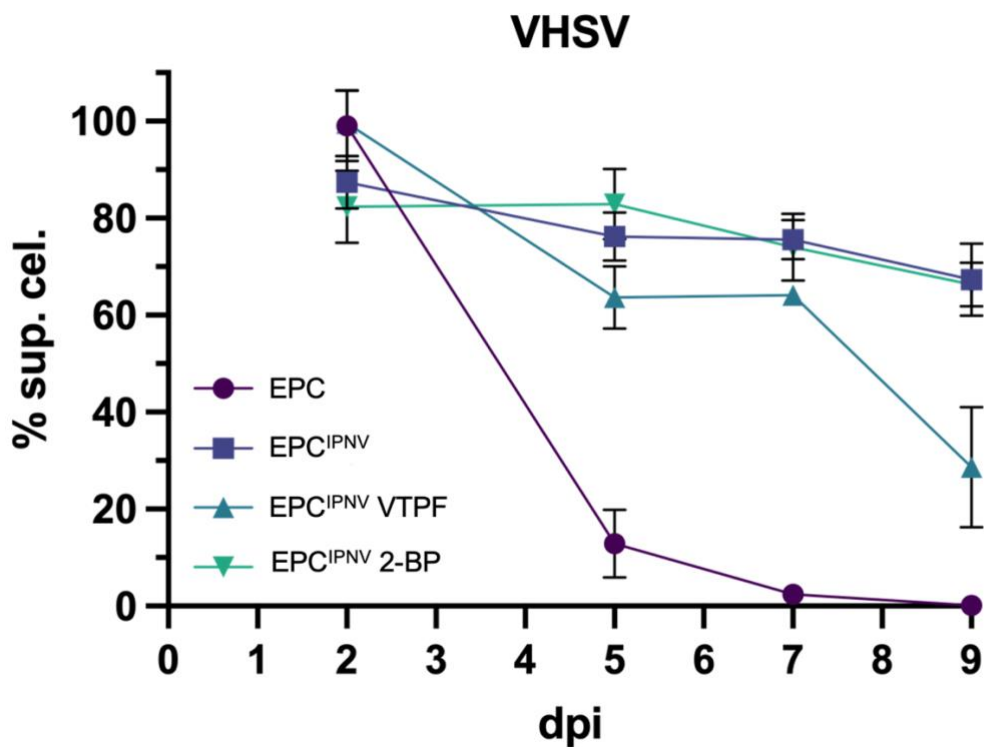


Figura 24. Cinética de infección con VHSV ($\text{moi}=0,02$ virus/célula) junto con los tratamientos VTPF ($1\mu\text{M}$) y 2-BP ($25\mu\text{M}$) sobre células EPC y EPC^{IPNV}. Cada punto representa la media del triplicado con su correspondiente desviación estándar. El promedio del triplicado control no infectado de cada tipo celular se consideró como el 100% de referencia para cada uno.

Como era de esperar, las células EPC infectadas con VHSV van muriendo con el paso de los días. En cuanto a las células EPC^{IPNV}, mantienen la supervivencia celular hasta el 70% tras 9 días post-infección, tanto en el control de infección como las tratadas con 2-BP. En el caso de la VTPF, la supervivencia celular es similar a las no tratadas, excepto en el día 9 post-infección, que cae al 30% (**Figura 24**).

5. DISCUSIÓN

5.1 Respuesta inmune innata antiviral

La respuesta inmunitaria innata mediada por IFN proporciona una sólida primera línea de defensa contra virus y bacterias. La unión de IFN a receptores de la superficie celular inicia una cascada de señalización a través de la vía JAK-STAT, que conduce a la regulación transcripcional de ISG. Esto concede a la célula un estado antiviral efectivo contra virus y otros patógenos (Schneider et al., 2014).

Hoy en día las enfermedades causadas por virus suponen una amenaza constante para la producción acuícola. Para que la acuicultura sea sostenible es fundamental comprender mejor el funcionamiento de los mecanismos que intervienen en el establecimiento de un estado antiviral (Ortega-Villaizan et al., 2022). Por lo que, encontrar posibles moduladores de la respuesta inmunitaria innata es un enfoque excelente para desarrollar estrategias contra la replicación de los virus en peces.

La motivación de este trabajo se basa en estudios previos realizados en nuestro laboratorio, en los que se pudo observar los efectos de VTPF y 2-BP en células de pez infectadas por SVCV.

El pretratamiento con VTPF en la línea celular ZF4 durante 24 horas previas a la infección parecía inhibir la replicación de SVCV y los niveles de expresión de *ifitm1*, *ifitm5* e *isg15* (Talavera et al., 2021). Posteriormente, las investigaciones sobre el compuesto se continuaron sobre la línea celular EPC, y se observó que el tratamiento con VTPF: protegía durante la infección con SVCV, inhibía la replicación viral de SVCV y estimulaba la expresión de genes de la respuesta inmune innata (*ifitm1* e *irf3*) (Gómez-Quintanilla et al., 2022).

En el caso de 2-BP, se observó una disminución de la síntesis de RNA viral de SVCV y un aumento del tamaño de los sincitios, que son el resultado de la fusión de una célula infectada con las células vecinas (García et al., 2022).

A raíz de los resultados obtenidos con ambos compuestos, se decidió continuar la investigación, centrándonos también en VHSV, otro Rhabdovirus de pez, y en otros

genes de la respuesta inmune innata como *mx* (un marcador de IFN) y *sting* (la proteína STING se encuentra palmitoilada).

5.2 Efecto de VTPF y 2-BP sobre células en estado basal

La VTPF, como se ha descrito previamente, es un inhibidor de la vía Hippo-YAP. YAP es una proteína implicada en la regulación negativa de la ruta de IFN (Wang et al., 2020). Por tanto, VTPF debe tener un efecto antiviral, pero apenas existe literatura sobre el uso de VTPF en virus, ya que el fármaco ha sido utilizado, sobre todo, como antitumoral y como tratamiento para la degeneración macular relacionada con la edad (Wang et al., 2016). El efecto antiviral de VTPF se observa cuando se pretratan las células antes de la infección, lo que coincide con otros autores en el que la administración de VTPF 24 horas antes de la infección redujo significativamente la replicación y producción viral de SARS-CoV-2; y del nivel de proteína YAP/TAZ en células de cáncer de pulmón humano (Calu-3) (García et al., 2022). Por el contrario, el pretratamiento con VTPF no parece proteger contra VHSV. Por lo que se necesitan realizar más ensayos para confirmar si realmente existen estas diferencias entre los virus.

El 2-BP es un inhibidor de la palmitoilación. Esta modificación postraduccional puede influir en las interacciones proteína-proteína y proteína-membrana (Lee y Zheng, 2021). Nuestros resultados revelan que 2-BP parece inhibir la replicación de VHSV, este hecho podría deberse a la inhibición de la palmitoilación de la proteína G de VHSV, aunque en el caso del Rhabdovirus de mamífero (VSV), la inhibición de la palmitoilación de esta proteína no parece reducir la infección (Thorp et al., 2006). En cambio, en el caso de SVCV, 2-BP no parece proteger contra la infección. Al contrario, lo que se había observado anteriormente es que aumentaba la fusión de membranas inducida por SVCV (García et al., 2022). Este hecho puede deberse a que el compuesto no es específico, y puede tener más de un efecto. Por ejemplo, en el caso del virus del Zika se observó que la inhibición de la palmitoilación por 2-BP aumentaba los niveles de RNA viral y la expresión de proteínas virales en células Vero (Hu et al., 2023). No se descarta que el efecto de 2-BP pueda estar condicionado por la temperatura, las infecciones de VHSV son a 14°C, y las de SVCV a 21°C.

Por otra parte, la palmitoilación de proteínas involucradas en la vía del IFN, como STING e IFITM, es crucial para conseguir un estado antiviral (Lee y Zheng, 2021). STING es esencial para la respuesta de IFN I contra patógenos en peces, ya que desempeña un papel fundamental en la respuesta al RNA citosólico extraño (Biacchesi et al., 2012). El tratamiento con 2-BP suprime la palmitoilación de STING, lo cual puede inhibir la producción de IFN I (Mukai et al., 2016).

5.3 Efecto de VTPF y 2-BP sobre células inmunoestimuladas

Se ha demostrado que el Birnavirus IPNV, un virus con genoma RNA de doble cadena, es un buen inductor de genes antivirales (*ifn* y *mx*) (Villalba et al., 2017). La línea celular persistentemente infectada con IPNV (EPC^{IPNV}) exhibe actividad antiviral contra la infección del virus VHSV, esto se debe a que la respuesta inmunitaria innata se encuentra continuamente activada en este tipo de células (García et al., 2011; Jurado et al., 2013; Parreño et al., 2016). El dsRNA ha sido reconocido por la célula como un patrón molecular percibido como “extraño”. Por lo que se considera que el dsRNA es un inductor muy eficaz de la respuesta inmunitaria innata celular. El dsRNA sintético poly I:C es una herramienta común en investigación del sistema inmune, ya que induce una respuesta fuerte y rápida al IFN en células de carpa (Ortega-Villaizan et al., 2022).

Para comprobar el efecto antiviral que poseen las células EPC^{IPNV}, se midieron los niveles de expresión de genes involucrados en la respuesta inmune innata, como *irf3*, *mx* y *sting*. Los resultados mostraron un aumento notable de los tres genes en células EPC^{IPNV}, en especial *irf3* y *mx*, con respecto al control EPC. Esto era esperado, ya que previamente se había demostrado la mayor expresión del gen *mx* en las células EPC^{IPNV} (Jurado et al., 2013). A su vez, se realizaron ensayos de supervivencia celular para comprobar el efecto protector contra VHSV. Las células mantuvieron el 100% de supervivencia celular tras 5 días de infección con VHSV, confirmando que la infección persistente con IPNV induce un estado antiviral en las EPC^{IPNV}, al igual que se había descrito en otros trabajos (García et al., 2011; Parreño et al., 2016).

En los ensayos con VTPF como pretratamiento en células EPC^{IPNV} parece aumentar los niveles de expresión del gen *ipnv-a* y disminuir los niveles de expresión de *mx*.

Estos dos hechos parecen estar relacionados, ya que en los ensayos de supervivencia celular las células EPC^{IPNV} pretratadas 24 horas antes con VTPF no pueden hacer frente al desafío con VHSV. La inducción de niveles altos de *mx* en las células infectadas persistentemente por IPNV es un indicador de la producción de IFN I, que puede ser el responsable de frenar la propagación del virus y mantener un porcentaje muy bajo de células infectadas por IPNV en el cultivo. La reactivación del virus puede producirse, ya que parece que el IFN no anula por completo el crecimiento de IPNV, si no que provoca un retraso en la síntesis de proteínas virales (García et al., 2011).

Es difícil interpretar los resultados de 2-BP, ya que es un inhibidor inespecífico y tiene múltiples dianas. Sí que se ha descrito que inhibe la replicación de algunos virus, como en el caso del SARS-CoV-2, en el que se ha observado que la inhibición de la palmitoilación de la proteína S, esencial para la fusión de membranas, protege contra la infección del virus (Ramadan et al., 2022). Pero como hemos visto con anterioridad, en otros casos el uso de 2-BP aumentaba los niveles de RNA viral y la expresión de proteínas virales (Hu et al., 2023). Tampoco disponemos de un ensayo directo de palmitoilación de proteínas, lo que dificulta extraer una conclusión definitiva sobre la acción de 2-BP.

A pesar de su falta especificidad, el 2-BP puede tener utilidad como herramienta para la comprensión de la importancia de la palmitoilación de proteínas en la replicación viral. Su efecto notable en la fusión de membranas inducida por SVCV es un ejemplo de ello (García et al., 2022).

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

De los resultados obtenidos podemos concluir que:

- ❖ VTPF usada como pretratamiento parece tener un efecto protector contra SVCV, pero no contra VHSV en células EPC.
- ❖ El pretratamiento de células EPC con VTPF produce la estimulación de genes de la respuesta inmune innata (*irf3*, *mx* y *sting*).
- ❖ 2-BP parece inhibir la replicación de VHSV, pero no de SVCV en células EPC. Pero no parece estar relacionado con la estimulación de genes de respuesta inmune.
- ❖ El uso de VTPF en células EPC^{IPNV} parece aumentar la replicación de IPNV, lo que va acompañada de una bajada de la respuesta mediada por IFN.
- ❖ Las células EPC^{IPNV} pretratadas con VTPF no pueden hacer frente al desafío con VHSV, lo que confirma que el estado antiviral provocado por la infección persistente con IPNV se ha visto alterado.

En cuanto a las perspectivas futuras o posibles continuaciones de esta investigación podrían ser:

- ❖ Confirmar las diferencias encontradas entre SVCV y VHSV, y resolver alguna discrepancia de los resultados obtenidos.
- ❖ Comprobar el efecto de sobrenadantes de células EPC y EPC^{IPNV} tratadas con VTPF.
- ❖ Determinar los efectos de inhibidores de STING sobre la infección de SVCV y VHSV.
- ❖ Los resultados obtenidos en este trabajo se presentarán en un póster científico en el *21th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish* en Aberdeen, Reino Unido.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Ablasser A, Hur S. (2020) Regulation of cGAS- and RLR-mediated immunity to nucleic acids. *Nature Immunology* 21:17–29.
- ❖ Alberts B, Johnson A, Lewis J. (2002) The adaptive immune system. *Molecular Biology of the Cell* (4th ed. Chapter 24).
- ❖ Ashraf U, Lu Y, Lin L, Yuan J, Wang M, Liu X. (2016) Spring viremia of carp virus: recent advances. *Journal of General Virology* 97:1037-51.
- ❖ 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.
- ❖ Biacchesi S, Mérour E, Lamoureux A, Bernard J, Brémont M. (2012) Both STING and MAVS fish orthologs contribute to the induction of interferon mediated by RIG-I. *PLoS One* 7:47737.
- ❖ De Kinkelin P, Chilmonczyk S, Dorson M, Le Berre M, Baudouy AM. (1979). Some pathogenic facets of rhabdoviral infection of salmonid fish. *In Proceedings of the 4th Munich symposium on microbiology: mechanisms of viral pathogenesis and virulence* (pp. 357-375). Munich, Germany: World Health Organization (WHO).
- ❖ Einer-Jensen K, Ahrens P, Forsberg R, Lorenzen N. (2004) Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus. *Journal of General Virology* 85:1167-79.
- ❖ Ezeonwumelu IJ, García-Vidal E, Ballana E. (2021) JAK-STAT Pathway: A Novel Target to Tackle Viral Infections. *Viruses* 13:2379.
- ❖ Frerichs GN, Millar SD, Alexander M. (1989). Rhabdovirus Infection of Ulcerated Fish in South-East Asia. *Viruses of Lower Vertebrates*.

- ❖ García I, Galiana A, Falcó A, Estepa A, Perez L. (2011) Characterization of an infectious pancreatic necrosis (IPN) virus carrier cell culture with resistance to superinfection with heterologous viruses. *Veterinary Microbiology* 149:48-55.

- ❖ García L, Ortega-Villaizán M, Perez L. (2022) Efecto de un inhibidor de acilación en células infectadas con virus de pez. *Trabajo Fin de Grado*. Universidad Miguel Hernández de Elche.

- ❖ Gómez-Quintanilla A, García-Martínez L, Saceda M, Perez L. (2022) Effect of the antitumoral drug verteporfin on the replication of spring viraemia of carp virus (SVCV). Póster presentado al congreso Aquaculture Europe 2022, Rimini, Italia.

- ❖ Hu D, Zou H, Chen W, Li Y, Luo Z, Wang X, Guo D, Meng Y, Liao F, Wang W, Zhu Y, Wu J, Li G. (2023) ZDHHC11 Suppresses Zika Virus Infections by Palmitoylating the Envelope Protein. *Viruses*. 15:144.

- ❖ Huang Y, Ahmad US, Rehman A, Uttagomol J, Wan H. (2022). YAP Inhibition by Verteporfin Causes Downregulation of Desmosomal Genes and Proteins Leading to the Disintegration of Intercellular Junctions. *Life* 12:792.

- ❖ Ishikawa H, Barber G. (2008). STING is an endoplasmatic reticulum adaptator that facilitates innate immune signalling. *Nature* 455:674-78.

- ❖ Jurado MT, García-Valtanen P, Estepa A, Perez L. (2013) Antiviral activity produced by an IPNV-carrier EPC cell culture confers resistance to VHSV infection. *Veterinary Microbiology*. 166:412-8.

- ❖ Kanellos T, Sylvester ID, D'Mello F, Howard CR, Mackie AS, Dixon PB, Chang K, Ramstad A, Midtlyng PJ, Russell P. (2006). DNA vaccination can protect *Cyprinus carpio* against spring viraemia of carp virus. *Vaccine* 24:4927-33.

- ❖ Lan T, Delalande C, Dickinson B. (2021) Inhibitors of DHHC family proteins. *Current Opinion in Chemical Biology* 65:118-25.
- ❖ Lee K, Zheng C. (2021). The emerging roles of ZDHHCs-mediated protein palmitoylation in the antiviral innate immune responses. *Critical Reviews in Microbiology* 47:34-43.
- ❖ Li X, Shen L, Xu Z, Liu W, LiA, XU J. (2022). Protein Palmitoylation Modification During Viral Infection and Detection Methods of Palmitoylated Proteins. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12:821596.
- ❖ McMichael TM, Zhang L, Chemudupati M, Hach JC, Kenney AD, Hang HC, Yount JS. (2017) The palmitoyltransferase ZDHHC20 enhances interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3) palmitoylation and antiviral activity. *Journal of Biological Chemistry* 292:21517-26.
- ❖ Meier W, Schmitt M, Wahli T. (1994) Viral hemorrhagic septicemia (VHS) of nonsalmonids. *Annual Review of Fish Diseases* 4:359-73.
- ❖ Mukai K, Konno H, Akiba T, Uemura T, Waguri S, Kobayashi T, Barber GN, Arai H, Taguchi T. (2016) Activation of STING requires palmitoylation at the Golgi. *Nature Communications*. 2016 7:11932.
- ❖ Munro ES, Gregory A. (2010) The risk associated with vertical transmission of viral haemorrhagic septicaemia virus (VSHV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol* 30:154–158.
- ❖ Ortega-Villaizan M, Chico V, Perez L. (2022) Fish Innate Immune Response to Viral Infection – An Overview of Five Major Antiviral Genes. *Viruses* 14:1546.
- ❖ Parreño R, Almagro L, Belló-Pérez M, Medina-Gali RM, Estepa A, Perez L. (2017) Restricted replication of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in a birnavirus-carrier cell culture. *Archives of Virology*. 162:1037-41.

- ❖ Poynter SJ, DeWitte-Orr SJ. (2016) Fish interferon-stimulated genes: The antiviral effectors. *Developmental and Comparative Immunology* 65:218-25.
- ❖ Ramadan AM, Mayilsamy K, McGill AR, Ghosh A, Giulianotti MA, Donow, HM, Mohapatra SS et al. (2022). Identification of SARS-CoV-2 Spike Palmitoylation Inhibitors That Results in Release of Attenuated Virus with Reduced Infectivity. *Viruses* 14:531.
- ❖ Riedel C, Hennrich A, Conzelmann K. (2020) Components and Architecture of the Rhabdovirus Ribonucleoprotein Complex. *Viruses* 12:959.
- ❖ Riera M, Pérez-Martínez D, Castillo C. (2016) Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology* 148:125-39.
- ❖ Schneider WF, Chevillote MD, Rice CM. (2014) Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annual Review of Immunology* 32:513-45.
- ❖ Smith NC, Rise ML, Christian SL. (2019) A Comparison of the Innate and Adaptive Immune Systems in Cartilaginous Fish, Ray-Finned Fish, and Lobe-Finned Fish. *Frontiers in Immunology* 10.
- ❖ Sobocińska J, Roszczenko-Jasińska P, Ciesielska A, Kwiatkowska K. (2018). Protein Palmitoylation and Its Role in Bacterial and Viral Infections. *Frontiers in Immunology* 8.
- ❖ Sun F, Zhang YB, Liu TK, Gan L, Yu FF, Liu Y, Gui JF. (2010) Characterization of fish IRF3 as an IFN-inducible protein reveals evolving regulation of IFN response in vertebrates. *Journal of Immunology* 185:7573-82.
- ❖ Talavera D, Saceda M, Pérez L. (2021) 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 de Elche.

- ❖ Thorp EB, Boscarino JA, Logan HL, Goletz JT, Gallagher TM. (2005) Palmitoylations on Murine Coronavirus Spike Proteins Are Essential for Virion Assembly and Infectivity. *Journal of virology*, 80:1280-89.
- ❖ Valero Y, Morcillo P, Meseguer J, Buonocore F, Cuesta A, Chaves-Pozo E. (2015) Characterization of the IFN pathway in the teleost fish gonad against vertically transmitted viral nervous necrosis virus. *Journal of General Virology* 96:2176-87.
- ❖ Villalba M, Pérez V, Herrera L, Stepke C, Maldonado N, Fredericksen F, Yáñez A, Olavarría VH. (2017) Infectious pancreatic necrosis virus infection of fish cell lines: Preliminary analysis of gene expressions related to extracellular matrix remodeling and immunity. *Veterinary Immunology Immunopathology*. 193-194:10-17.
- ❖ Wang C, Zhu X, Feng W, Yu Y, Jeong K, Guo W, Lu Y, Mills GB. (2016). Verteporfin inhibits YAP function through up-regulating 14-3-3 σ sequestering YAP in the cytoplasm. *Am J Cancer Res* 6:27–37.
- ❖ Wang Z, Lu W, Zhang Y, Zou F, Jin Z, Zhao T. (2020) The Hippo Pathway and Viral Infections. *Frontiers in Microbiology* 10.
- ❖ Wei C, Li X. (2020) The Role of Photoactivated and Non-Photoactivated Verteporfin on Tumor. *Frontiers in Pharmacology* 11:557429.
- ❖ World Organisation for Animal Health (2021) Septicemia hemorrágica viral. *Organización Mundial de la Sanidad Animal*. <https://www.woah.org/es/enfermedad/septicemia-hemorragica-viral/>
- ❖ World Organisation for Animal Health (2021) Viremia primaveral de la carpa. *Organización Mundial de la Sanidad Animal*. <https://www.woah.org/es/enfermedad/viremia-primaveral-de-la-carpa/>
- ❖ Yáñez DC, Ross S, Crompton T (2020) The IFITM protein family in adaptive immunity. *Immunology* 159:4.

- ❖ Zhang Y, Gui, J. (2012). Molecular regulation of interferon antiviral response in fish. *Developmental and Comparative Immunology* 38:193-202.
- ❖ Zhao X, Li J, Winkler CA, An P, Guo JT. (2018) IFITM genes, variants, and their roles in the control and pathogenesis of viral infections. *Frontiers in Microbiology* 9: 3228.