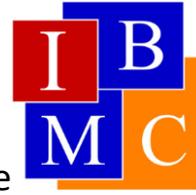




Universidad Miguel Hernández de Elche



Instituto de biología molecular y celular

Departamento de bioquímica y biología molecular

Área de conocimiento: Virología

Actividad antiviral de cúrcuma y extractos de plantas del género Cistus. Efecto sobre el virus de la septicemia hemorrágica de salmón.

Autor: Eva María Moya González

Tutor: Luis Pérez García-Estañ

Facultad de ciencias experimentales

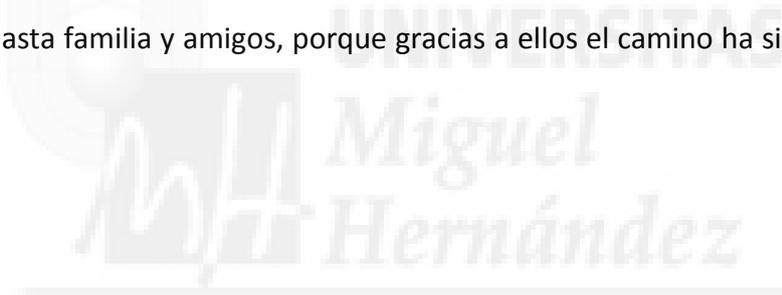
Grado en biotecnología (2015 – 2016)

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a todas las personas que considero que han estado vinculadas de alguna manera en este trabajo. Primero, me gustaría dar mi más amplio agradecimiento a mi tutor del TFG, **Luis Pérez García-Estañ**, por haberme dado la oportunidad de aprender cómo se trabaja en un laboratorio y sumirme plenamente en el campo de la virología.

Asimismo, también me gustaría agradecer a las personas que me han facilitado los extractos, **Enrique Barraón y Vicente Micol**, porque han sido el pilar de este trabajo, y a **Irene Mudarra** por su apoyo técnico, sin los cuales este trabajo no hubiera sido posible.

Por último, agradecer a todas esas personas que han estado ahí, desde profesores hasta familia y amigos, porque gracias a ellos el camino ha sido mucho más fácil.



Índice de abreviaturas

EPC: *Epitelioma Papullosum Cyprini*

CHSE: *CHinook Salmo Embryo*

RPMI: Medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute*

VHSV: *Viral Hemorrhagic Septicemia Virus*

SVCV: *Spring Viraemia of Carp Virus*

IPNV: *Infectious Pancreatic Necrosis Virus*

TCID50: *50% Tissue Culture Infective Dose*

MTT: *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium*

Palabras clave

Acuicultura, antivirales, fitoterapia, VHSV, *Cistus*

Resumen

Las enfermedades de origen viral suponen una seria amenaza para la Acuicultura, causando lamentables pérdidas económicas. Dos son las formas en las que se puede abordar este problema: la prevención (mediante vacunas) y la terapia. Las plantas llevan décadas siendo una fuente de fármacos con actividad antiviral. Este trabajo evalúa la actividad inhibitoria de compuestos de origen vegetal frente a un virus de gran importancia en el cultivo de trucha y salmón: el virus de la septicemia hemorrágica vírica (VHSV).

Se probó el efecto de seis extractos de *Cistus* (denominados de E1 a E6), a ciegas, sobre la replicación del virus en una línea celular de carpa (EPC). Dos de los extractos (E2 y E5) muestran actividad inhibitoria frente a VHSV a una concentración de 20-40 µg/ml al añadirlos durante la infección. Se determinó también su actividad frente a otro virus de salmón (IPNV) y frente al virus de carpa SVCV.

En base a estudios previos, en los que se ha demostrado la actividad anti-VHSV de la cúrcuma, se estudió su efecto utilizando tanto una preparación cruda como una filtrada. Los resultados muestran que la preparación cruda tiene capacidad de inhibir la replicación de VHSV, pero es poco homogénea y tiende a precipitar. La preparación filtrada, por el contrario, carece de actividad antiviral significativa.

Abstract

The diseases of viral origin pose a serious threat for the Fish farming, causing devastating economic losses. Two are the ways to approach this problem: prevention (by means of vaccines) and therapy. Plants have been for decades being a source of compounds with antiviral activity. This study evaluates the inhibitory activity of plant compounds against a great important virus in the culture of trout and salmon: *Viral Hemorrhagic Septicemia Virus* (VHSV).

Here we tested the effect of six Cistus's extracts (named of E1 to E6), blindly, on the replication of the virus in a cellular line of carp (EPC). Two of the extracts (E2 and E5) show inhibitory activity against VHSV at concentrations of 20-40 µg/ml when we added them during the infection. E2 and E5 also seems to have activity against another virus of salmon (IPNV) and against a virus of tent (SVCV).

In previous studies, the anti-VHSV activity of curcumin has been reported, also the effect on VHSV was studied using so much a raw preparation as a well as a filtered solution. The results show that the raw preparation can disable VHSV replication, but it is slightly homogeneous and tends to precipitate. The filtered preparation, on the contrary, has not significant activity.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1. Cultivos celulares	11
3.2. Virus y titulación	11
3.3. Preparación de extractos	12
3.4. Ensayo de citotoxicidad: ensayo MTT	13
3.5. Ensayos de actividad antiviral	14
3.6. Tinciones, absorbancias y cálculos	15
4. RESULTADOS	17
4.1. Actividad antiviral de extractos de cistus	17
4.1.1.Citotoxicidad de los extractos	17
4.1.2.Actividad anti-VHSV	18
4.1.3.Actividad sobre otros virus de pez	22
4.2. Actividad antiviral de cúrcuma	25
4.2.1.Cúrcuma sin filtrar	25
4.2.2.Cúrcuma filtrada	27
5. DISCUSIÓN	29
6. CONCLUSIÓN	35
7. BIBLIOGRAFÍA	36

1. Introducción

Comer pescado forma parte de la tradición cultural de muchas personas y, en términos de beneficios para la salud, tiene un excelente perfil nutricional: es una buena fuente de proteínas, ácidos grasos, vitaminas, minerales y micronutrientes esenciales.

A finales del siglo pasado y a principios del nuevo milenio, la pesca de captura ha mantenido su producción sin sufrir apenas cambios. En 2013 se alcanzó el máximo de capturas, que ascendió a 93,8 millones de toneladas, sin llegar a sobrepasar en ningún momento los 95 millones de toneladas que se auguraba como techo definitivo a la actividad pesquera.

La estabilización de la pesca en unos niveles prácticamente imposibles de superar, junto con el aumento incesante de la demanda de productos acuáticos, es lo que ha impulsado el desarrollo de la acuicultura como alternativa para el abastecimiento mundial de estos productos. Y es precisamente desde el momento en que se estanca la actividad pesquera, cuando se produce el despegue definitivo de la acuicultura, llegando a superar a la pesca por primera vez en 2013 con una producción de 97,20 millones de toneladas a nivel mundial (**Figura 1**). Por tanto, más de la mitad del total de los alimentos de origen acuático consumidos hoy por la población mundial, así como los productos destinados a usos no alimentarios, procede de granjas acuícolas (**Figura 2**) en las que se crían peces, crustáceos, algas, moluscos y otros invertebrados.

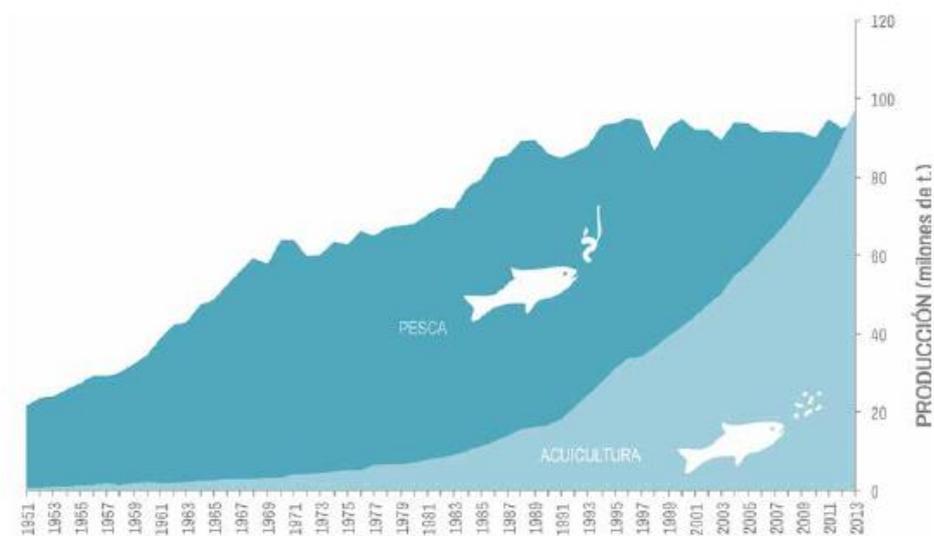


Figura 1. Evolución de la producción de acuicultura y pesca mundial en el periodo 1951-2013 (FAO 2015).

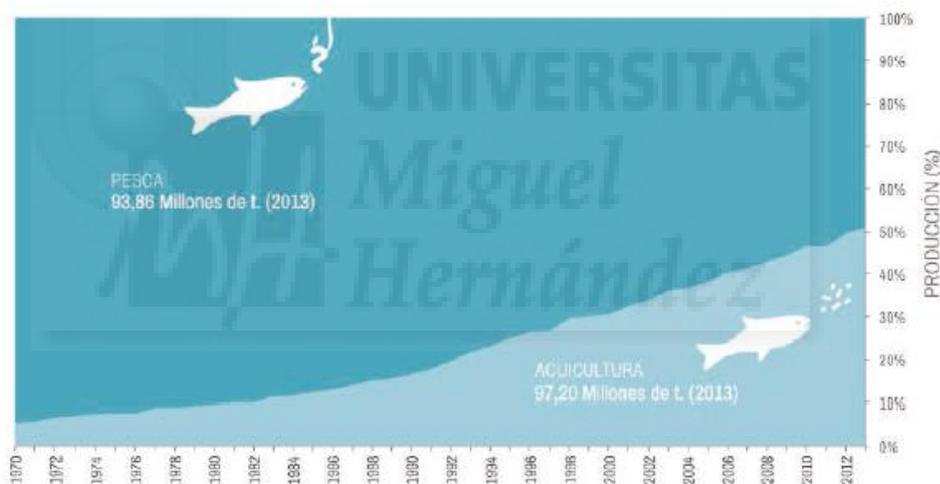


Figura 2. Evolución porcentual de la producción acuática mundial en el periodo 1970-2013 (FAO 2015).

Casi la mitad de toda la producción mundial de la acuicultura en 2013 consistió en pescado, el 48,4% (unas 47 millones de toneladas), pero el incremento de la producción ha tenido lugar en todos los grupos de especies. La cosecha de vegetales representó el 27,8% de las toneladas, la de moluscos el 16%, crustáceos el 6,9%, el grupo anfibios-reptiles el 0,5% y otros invertebrados el 0,4% restante (**Figura 3**).

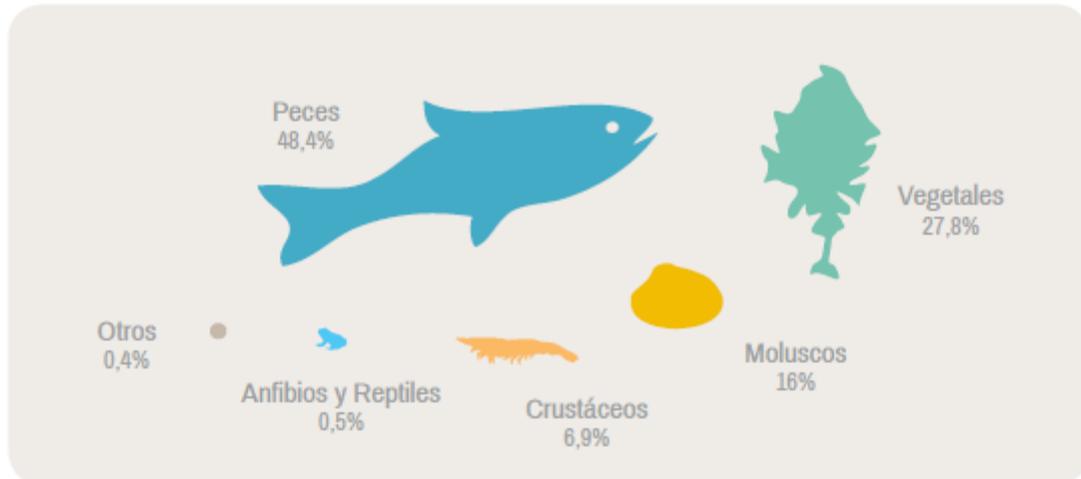


Figura 3. Distribución porcentual de la producción de la acuicultura mundial en 2013 por grupos según la FAO.

La mayor producción obtenida por la acuicultura Europea engloba a 6 especies de peces (**Figura 4**) distribuidas en diferentes posiciones geográficas (**Figura 5**). En los últimos 10 años la producción anual más alta fue para el salmón Atlántico *Salmo salar* (~900 kTm/año), la trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* (~320 kTm/año), la dorada *Sparus aurata* (~150 kTm/año), la lubina *Dicentrarchus labrax* (~140 kTm/año), la carpa *Cyprinus carpio* (~70 kTm/año) y el pez plano *Scophthalmus maximus* (~10 kTm/año) (Gomez-Casado, Estepa et al. 2011). Mientras que la producción del salmón, la trucha y la carpa se mantiene estable, la producción de dorada, lubina y rodaballo tiende a aumentar.

A pesar del crecimiento que está teniendo la industria de la acuicultura, esta ha de enfrentarse constantemente con enfermedades de origen bacteriano y vírico. Un ejemplo es la infección que tuvo lugar en Chile, donde se sitúa el principal mercado mundial del salmón no salvaje, entre 2007 y 2009. Un brote del virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV) acabó con millones de salmónes de una empresa acuícola, lo que ocasionó la eliminación de puestos de trabajo y pérdidas económicas de hasta 5.000 millones de dólares. Similar fue el brote vírico que tuvo lugar en unas instalaciones de Canadá, por el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHN), que ocasionó la muerte de millones de salmónes, con unas pérdidas por valor de 18 millones de dólares a la empresa acuícola y 100 millones de dólares al gobierno canadiense.

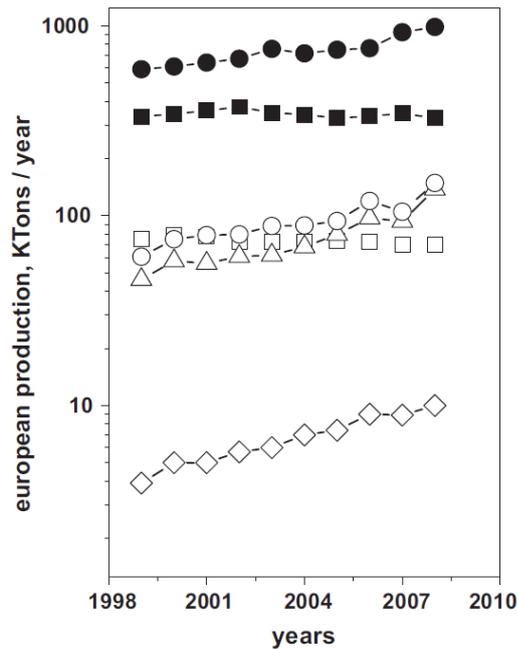


Figura 4. Producción relativa durante los últimos años de las principales especies acuícolas Europeas. Datos de la FEAP (Federation of European Fish Producers, publicado en su página (<http://www.aquamedia.org>)). (●) Salmon; (■) trucha; (□) carpa; (○) dorada; (▲) lubina; (◇) rodaballo.

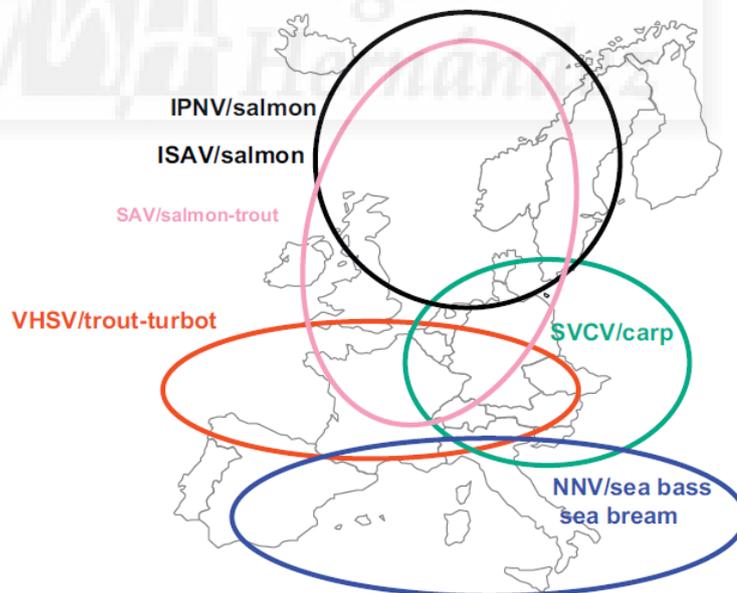


Figura 5. Distribución geográfica aproximada de las enfermedades virales de la acuicultura Europea. Los virus principales y las especies afectadas son: VNNV (dorada y lubina), IPNV (salmón), VHSV y IHNV (trucha y salmón), SVCV (carpa), SAV (salmón y trucha) y ISAV (salmón). (Gomez-Casado, E. et al, 2011)

La acuicultura intensiva está creciendo más rápido que el resto de sectores de producción animal. Para conseguir altos niveles de producción, los problemas asociados a enfermedades virales deben ser controlados, ya que estos causan altas tasas de mortalidad con el consiguiente impacto ecológico y las enormes pérdidas económicas. Por ello, cada vez son más las investigaciones que se llevan a cabo para descubrir nuevos agentes terapéuticos que puedan combatir estas infecciones. Dos son las formas en las que se aborda este problema: la prevención (mediante vacunas) y la terapia.

Hay vacunas disponibles para más de 17 especies de peces y estas protegen de más de 22 enfermedades bacterianas y 6 enfermedades virales. Las vacunas están disponibles en más de 40 países (**Figura 6**). A pesar de que un gran número de países tienen autorizadas algunas de las vacunas, la vacunación es más usada para las especies industrializadas en los países representados en la figura (Brudeseth, Wiulsrod et al. 2013).

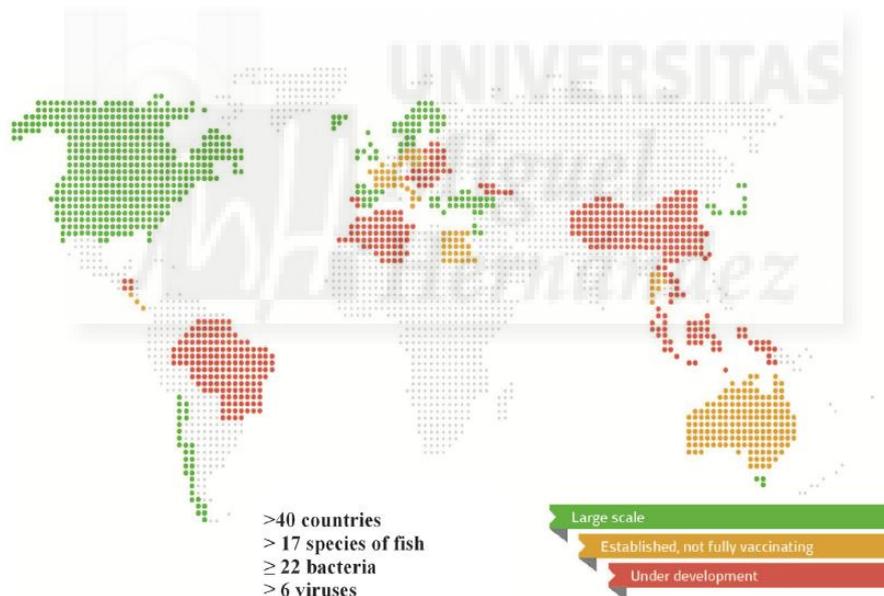


Figura 6. Clasificación de los países de acuerdo al uso y la implementación de la vacunación en los peces. El verde representa los países donde la vacunación es muy usada. El amarillo representa los países es usada pero no está totalmente implementada. El rojo representa los países donde la vacunación de peces no está desarrollado. (Brudeseth BE, et al. 2013).

Además de las vacunas, se han desarrollado una gran variedad de terapias para combatir las infecciones víricas en peces, que abarcan a una enorme variedad de compuestos. Un ejemplo es la inyección de un glicano de *Saccharomyces* a truchas. A

los 16 días de la inyección de *Saccharomyces* se infectó a los peces por inmersión con IHN, no observándose ninguna mortalidad (LaPatra 1998). También se ha demostrado en varios estudios que la ribavirina, un nucleósido sintético en el que la base nitrogenada es la tiazolcarboximida, tiene actividad antiviral frente a varios tipos de virus. En concreto, inhibe la replicación de ISAV (Rivas-Aravena, Vallejos-Vidal et al. 2011) y de IHN e IPNV (Virus de la necrosis pancreática infecciosa) en células de salmón (Hudson, Graham et al. 1988), y del virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) en células de trucha (Marroqui, Estepa et al. 2007).

Una fuente de compuestos antivirales con un enorme potencial son las plantas. Se han descrito una gran cantidad de compuestos procedentes de estas con actividad antiviral frente a virus de peces. Un caso de compuestos de origen vegetal con actividad antiviral son el crisofanol y la aloe-emodina, presentes en el extracto de *Rheum Palmatum*, una planta medicinal china, que tiene efecto frente al flavivirus JEV (Chang, Huang et al. 2014) (Japanese Encephalitis Flavivirus). Otro ejemplo es el alga marina *Eisenia Bicyclis*, la cual se ha demostrado que inactiva IHNV al preincubar el extracto de alga con el virus durante 1 hora (Kamei and Aoki 2007), y *Polysiphonia morrowii*, cuyo extracto se ha demostrado que tiene efecto antiviral tanto al pretratar a IHNV como al pretratar las células (Kim, Kim et al. 2011).

En concreto, en este estudio nos centramos en dos tipos de preparados vegetales: extractos de plantas del género *Cistus* y cúrcuma, un compuesto que se obtiene de la raíz de la planta del mismo nombre.

El género *Cistus* lo forman especies de matas o arbustos con hojas opuestas, sin estípulas, con o sin peciolo y con flores grandes y vistosas (**Figura 7**). Viven en el típico clima mediterráneo y la Península Ibérica pudo ser el centro de dispersión mundial.



Figura 7. Flores de planta del género *Cistus*. Foto sacada de <http://www.perryhillnurseries.co.uk>

Se ha demostrado que el extracto de *Cistus* tienen efecto inhibitorio sobre el virus de la gripe al incubar las células en un paso previo a la infección (Ehrhardt, Hrinčius et al. 2007) o, también, tratando el virus con el extracto antes de infectar.

Por otro lado, la cúrcuma es una planta de la familia de las cingiberáceas (**Figuras 8**). Los rizomas o partes subterráneas se reducen en un polvo que tiene propiedades medicinales interesantes. Originalmente, el polvo se utilizaba como anti-inflamatorio y para tratar diversas enfermedades de la piel. Estudios recientes han demostrado que este polvo puede tener cierta capacidad antiviral frente a algunos virus de peces (Chen, Chen et al. 2013, Jeong, Vaidya et al. 2015, von Rhein, Weidner et al. 2016).



Figura 8. Planta de cúrcuma (izquierda) y rizomas de la planta de cúrcuma (derecha). Fotos sacadas de <http://www.plantasmedicinales10.com> y <http://www.hogarmania.com>

Según un artículo publicado por Chen TY y cols. en 2013, la cúrcuma tiene cierta capacidad inhibitoria de la infectividad de virus envueltos, posiblemente al modificar la bicapa lipídica y afectando a la función de las proteínas de la membrana del virus. Este efecto se observa tanto al pretratar las células como al tratarlas durante el periodo de infección (Chen, Chen et al. 2013). El estudio se realizó para virus tanto con genoma RNA como con genoma DNA, cuya única característica común era la envoltura, por lo que se sugiere que la cúrcuma podría tener efecto sobre todos los virus con envuelta, entre los que se incluye el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV), que es patógeno de trucha y salmón, especies muy importantes en la acuicultura. En relación a VHSV, que es uno de los virus que vamos a utilizar en este estudio, se ha demostrado que el pretratamiento celular con cúrcuma incrementa la supervivencia de las células tras la infección con VHSV (Jeong, Vaidya et al. 2015).



2. Antecedentes y objetivos

En el grupo de virus de peces del Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández, ya se han realizado previamente estudios para la determinación de la capacidad antiviral de ciertos compuestos, tanto sintéticos como naturales.

En cuanto a compuestos sintéticos, se llevó a cabo el estudio de efecto inhibitorio de la ribavirina y el ácido micofenólico (MPA) sobre la replicación de VHSV e IPNV (Marroqui, Estepa et al. 2008), en el que demostraron que el ácido micofenólico es más efectivo en la inhibición de virus de trucha que la ribavirina, especialmente frente a IPNV. Se observó que el efecto inhibitorio se produce tanto al pretratar las células como al añadirlo durante la infección.

También se ha estudiado el efecto de compuestos vegetales, en concreto el efecto anti-VHSV del extracto de hoja de olivo (Micol, Caturla et al. 2005). Se observó que tanto el extracto puro de la hoja de olivo como el compuesto oleuropeina producían una reducción de la propagación del virus cuando se incubaba VHSV con el extracto previamente a la infección.

El presente estudio se basa en el estudio de extractos vegetales y su efecto sobre ciertos virus. Concretamente, extractos de *Cistus* y cúrcuma. Los objetivos de este trabajo son:

1. Estudio de la citotoxicidad de los extractos utilizados en una línea celular de pez (EPC).
2. Determinación de la capacidad antiviral de los extractos de *Cistus*. Dentro de este apartado se incluye la determinación del modo de acción de los extractos.
3. Determinación del espectro de acción de estos extractos, es decir, ver si tienen efecto sobre diferentes tipos de virus como son VHSV, SVCV (virus de la viremia primaveral de carpa), e IPNV.

4. Determinar la capacidad antiviral de nuestro preparado de cúrcuma, fundamentalmente sobre VHSV.



3. Materiales y métodos

3.1. CULTIVOS CELULARES

3.1.1. Medios de cultivo

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo fueron cultivadas con medio RPMI modificado por Dutch con 20 mM (290 mOsm/Kg) (Gibco BRL-Invitrogen, Barcelona, España), 2 o 10% de suero fetal bovino (SFB, Linus-Cultek, Madrid), 2 mM de glutamina (Gibco BRL), 1 mM de piruvato sódico (Gibco BRL), 50 µg/ml de gentamicina (Gibco BRL) y 1,2 µg/ml de anfotericina (Gibco BRL). En el presente estudio se nombra a este medio de cultivo como RPMI 2 o 10%, dependiendo del porcentaje de suero fetal bovino en disolución.

3.1.2. Líneas celulares

La línea celular **EPC** (*Epitelioma Papullosum Cyprini*) procede de un pez de la familia de la carpa (*Pimephales promelas*). Fue comprada de la colección europea de cultivos celulares (identificación ECACC nº 93120820). Las células EPC se mantuvieron en frascos de cultivo de 25 cm² y 75 cm² de superficie, a 25 °C en medio RPMI 10%. Para subcultivarlas, las células se despegaron de los frascos con una solución de 0,05 % de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich) y se diluyeron con medio de cultivo al volumen necesario para sembrar los nuevos frascos o placas.

La línea celular **CHSE** (*CHinook Salmo Embryo*) es una línea celular embrionaria de salmón (*Oncorhynchus tshawytscha*). A diferencia de la línea EPC, son susceptibles de ser infectadas por el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV).

3.2. VIRUS Y TITULACIÓN

3.2.1. Virus

Se utilizaron tres tipos de virus: VHSV, el virus de la septicemia hemorrágica vírica, e IPNV (virus de la necrosis pancreática infecciosa), cuyas infecciones se

desarrollaron a 14°C; y SVCV (virus de viremia primaveral de la carpa), cuyas infecciones transcurren a 22°. Para los tres virus el medio utilizado fue RPMI 2%.

3.2.2. Titulación

Monocapas de células EPC fueron crecidas hasta el 100 % de confluencia en placas de 96 pocillos y, posteriormente, infectadas con 100 µl por pocillo de diluciones seriadas en medio RPMI 2% de sobrenadantes de EPC infectadas y que, a su vez, fueron tratadas con los respectivos extractos. La infección se mantuvo a 14° C hasta que se observó efecto citopático. Una vez concluido el período de infección, las monocapas se fijaron y se tiñeron con 0,1 % cristal violeta disuelto en formaldehído. La detección de lisis celular añadiendo HCl y midiendo la absorbancia.

El título de virus, expresado como TCID₅₀/ml, se calculó como el inverso de la última dilución con efecto citopático en el 50 % de los replicados, según la fórmula: $\frac{1}{10^{-(\log \text{ dilución } >50\% - I)}} \cdot 10$, donde I = (porcentaje pocillos infectados en la dilución donde se obtiene más del 50% de infección - 50%) / (porcentaje pocillos infectados en la primera dilución donde se obtiene más del 50% de infección - porcentaje de pocillos infectados en la primera dilución donde se obtiene menos del 50% de infección).

3.3. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

3.3.1. Extractos de *Cistus*

Los extractos fueron proporcionados por el Dr. Enrique Barraón (IBMC) bien en un stock a una concentración de 50 mg/ml o bien en forma de polvo. Su origen preciso y método de preparación no fueron revelados por lo que sencillamente se les denominó de E1 a E6. Los stocks de los extractos E1, E2 y E3 estaban disueltos en DMSO 100%, mientras que los stocks de los extractos E4, E5 y E6 eran polvo.

A partir de los stocks iniciales se preparó un stock a menor concentración, 5 mg/ml, que fue el utilizado en todos los ensayos para preparar las diluciones correspondientes. Para ello, los extractos E1, E2 y E3 se diluyeron con PBS y estos se

mantuvieron a 4°C. Por otro lado, los extractos E4, E5 Y E6 se diluyeron en PBS y DMSO en una proporción 9:1, y se mantuvieron a -20°C.

3.3.2. Cúrcuma

Se utilizó un extracto refinado de la raíz de la planta *Curcuma longa*, procedente de la empresa Labiofam (Cuba). Se preparó un stock de cúrcuma a una concentración de 20 mM, que fue el utilizado para realizar las diluciones en los ensayos. Para ello, se diluyó la cúrcuma aportada en 25% DMSO y 75% PBS.

3.4. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD: ENSAYO MTT

Este ensayo se empleó para determinar el nivel de toxicidad de los extractos utilizados en el trabajo. El ensayo de MTT nos da el porcentaje de viabilidad celular.

En primer lugar, se sembraron 70.000 células por pocillo y se dejaron 24 horas a 28°C gaseadas con CO₂. Una vez confluentes, se añadieron 100 µl por pocillo de los extractos a concentraciones crecientes y se vuelven a dejar a 28°C gaseadas durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo, se tratan las células con 100 µl de MTT, a una concentración inicial de 5 mg/ml, diluido en PBS en una relación 1:1 hasta una concentración final de 1,9 mg/ml. Se deja durante 3 horas a 28°C y, pasadas las 3 horas, se retira y se añade 100 µl de DMSO. El DMSO se deja actuar durante 30 minutos a 28°C. Pasados los 30 minutos se mide la absorbancia en el espectrofotómetro a 570 nm.

Las células vivas, metabólicamente activas, son capaces de transformar el bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), amarillo, en formazán, de color azul, gracias a la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenada. De esta forma se puede determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Es un método muy utilizado para medir la viabilidad celular puesto que la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

3.5. ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIVIRAL

3.5.1. Ensayo de tratamiento durante la infección

Con este ensayo se pretendía determinar si los extractos tenían algún efecto en el proceso de infección.

Para ello, se prepararon diluciones de los extractos con el virus a una moi de 0,01, virus por célula, con medio RPMI 2%, y se añadieron estas diluciones a los pocillos con células ya crecidas y confluentes. Este ensayo se realizó de dos formas: la primera fue dejando los extractos en el medio durante la infección, y la segunda fue retirando el medio con el inóculo del virus a los 90 minutos y añadiendo RPMI2%. Se utilizó la segunda cuando interesaba recoger sobrenadantes para titular.

3.5.2. Ensayo de pretratamiento celular

Este ensayo tuvo como finalidad determinar si los extractos tenían algún tipo de efecto sobre la capacidad de las células de defenderse frente al virus.

Para ello, se añadieron 100 μ L por pocillo de las diluciones preparadas de los extractos. Se dejaron incubar durante 24 horas. Pasadas 24 horas, se retiró por volcado el medio RPMI 2% en el que estaban diluidos los extractos y se infectaron las células añadiendo 100 μ L de RPMI2% en el que previamente se ha diluido el virus para alcanzar una multiplicidad de infección de 0,01.

Al retirar el medio en el que está diluido el extracto y añadir el medio con el virus, lo que conseguimos es que en el medio no haya extracto. Por tanto, el efecto que se observe únicamente se deberá al cambio que haya producido en la célula previamente a la infección y no el efecto que pueda tener sobre el virus al estar en el medio en el momento de la infección.

3.5.3. Ensayo de acción directa sobre el virus

En este ensayo se trató el virus con los extractos en un paso previo a la infección con el fin de determinar si los extractos tienen cierto efecto sobre la capacidad de infección del virus.

Los extractos se diluyeron junto con el virus en RPMI 2% hasta la concentración a la cual queríamos determinar su efecto. El virus debe quedar a una concentración superior a la concentración de infección. Así, posteriormente se diluye de tal forma que el virus queda a una multiplicidad de 0,01, que es la que interesa para infectar, mientras que el extracto queda a una concentración muy por debajo de a la cual tendría actividad. Esto se hace así para asegurar que el efecto observado se deba al efecto que puede tener el extracto sobre el virus y no sobre la infección o la célula.

Se dejaron actuar durante 90 minutos y, transcurrido ese tiempo, se añadieron 100 μ L por pocillo de la preparación anterior, diluyéndolo con RPMI 2%, de tal forma que el virus alcanza una moi de 0,01.

3.6. TINCIONES, ABSORBANCIAS Y CÁLCULOS

3.6.1. Tinciones con cristal violeta y con Giemsa

Esta tinción se empleó para obtener una medida cualitativa de la viabilidad celular. Una vez se observa un efecto citopático claro en las placas mediante el microscopio electrónico, se añaden 75 μ L por pocillo de violeta de metilo (cristal violeta) disuelto en formaldehído, sin retirar el medio, y se deja tiñendo una hora. Este colorante tiñe las células fijadas al plástico de los pocillos, permitiendo diferenciar los niveles de infección entre pocillos por inspección ocular.

En los casos en los que interesaba realizar fotografías en el microscopio óptico, se tiñeron las placas con Giemsa. Para ello, en primer lugar se retira el medio y se añaden 100 μ L por pocillo de metanol. Pasados 15 minutos se retira y se deja secar. Una vez esta seca la placa, se añaden 100 μ L de Giemsa por pocillo y se deja teñir media hora. En esta tinción, el efecto citopático debe ser menor que en el caso de teñir con cristal violeta

puesto que el metanol es más agresivo y levanta la células si no están suficientemente fijadas.

3.6.2. Medida de la absorbancia

Para obtener una medida cuantitativa de los resultados, en algunos experimentos se realizó una medición espectrofotométrica. Para ello, tras la tinción, se añadieron 100 μ L de ácido clorhídrico 0,1 N por pocillo y la dilución se midió en un espectrofotómetro de lectura de placas multipocillo. La longitud de onda a la que se midió la absorbancia fue a 620 nm en el caso del Giemsa y, en el caso de la tinción con cristal violeta, se utilizaron dos longitudes: 570 nm es el pico de absorción pero, en los casos en los que el espectrofotómetro daba error de saturación, se aumentó la longitud de onda a 620 nm.

3.6.3. Cálculo del % de supervivencia y del % de protección

Los resultados están expresados en porcentaje de viabilidad celular, en el ensayo de MTT o porcentaje de supervivencia celular y, en algunos casos, están expresados en % de protección.

El porcentaje de viabilidad celular se calcula considerando que la media de los valores de absorbancia de los controles sin tratar representa un 100% de viabilidad celular y el resto de valores se sacan en base a ese porcentaje. El porcentaje de supervivencia celular se calcula considerando que la media de los controles sin infectar representa el 100% de supervivencia celular y el resto de valores se sacan en base a ese valor. El porcentaje de protección se calcula considerando 100% a la diferencia entre los controles sin infectar y los controles infectados.

En los tres casos, los experimentos se realizan por triplicado y se calcula la media y la desviación estándar del triplicado.

4. Resultados

4.1. ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE EXTRACTOS DE PLANTAS DEL GÉNERO *CISTUS*

Como se indicó anteriormente, partimos de seis extractos (E1 a E6) cuya preparación y composición era desconocida para nosotros.

4.1.1. Citotoxicidad de los extractos

El ensayo MTT se realizó para determinar la citotoxicidad de los extractos E1, E2, E3, E4, E5 Y E6 a 5 concentraciones crecientes, en células EPC. Los resultados están recogidos en la **figura 9**. Se observó un descenso de la viabilidad celular en el extracto E4 del 100% al 36% a una concentración de 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y al 3.8% a una concentración de 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$. En el resto de los extractos la viabilidad descendió un poco con respecto al control sin tratar, pero no fue un descenso tan marcado como en el caso del extracto E4.

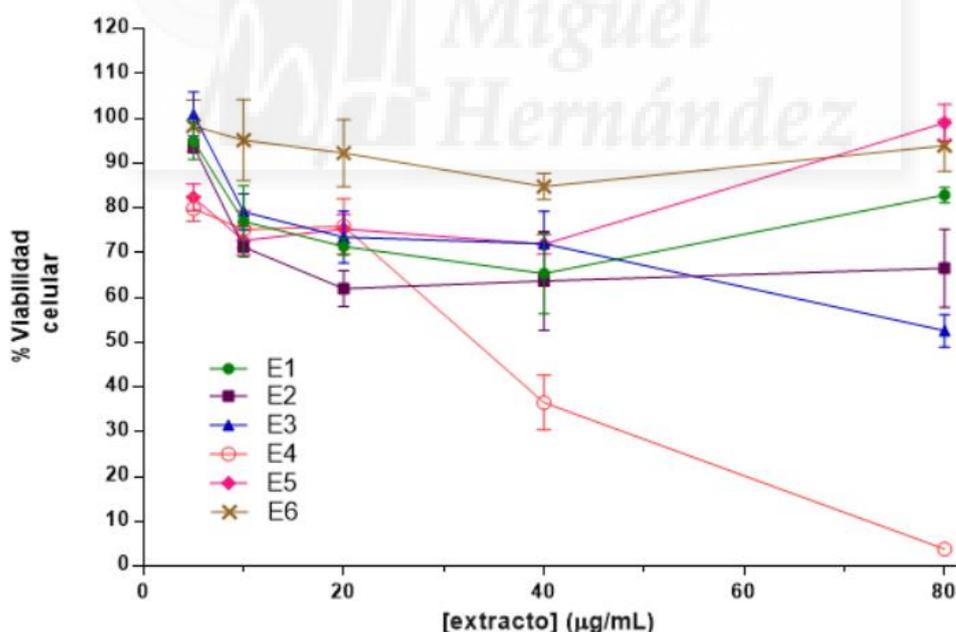


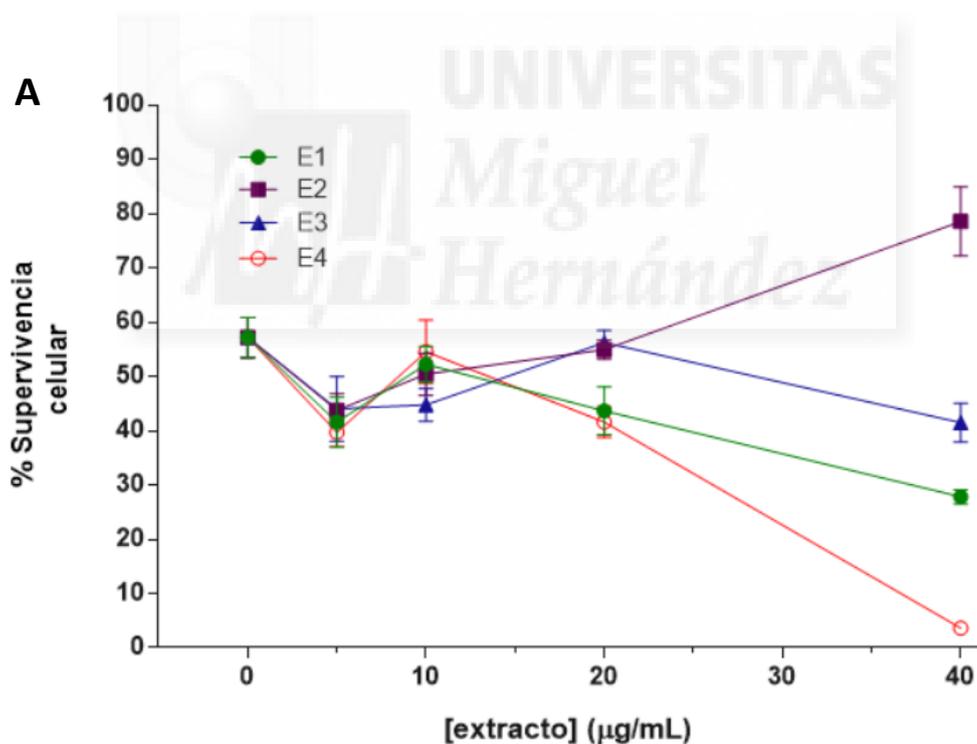
Figura 9. Ensayo de citotoxicidad MTT de los diferentes extractos a concentraciones crecientes en la línea celular EPC a los 2 días de tratamiento. La absorbancia se midió a 570 nm y se determinó el % de viabilidad considerando como control las células no tratadas (100% viabilidad celular). El ensayo se realizó por triplicado y se representan las medias con sus respectivas desviaciones estándar.

4.1.2. Actividad anti-VHSV

Para determinar la actividad anti-VHSV de los extractos se procedió a realizar tres tipos de ensayos: ensayo de pretratamiento celular, ensayo de acción directa sobre el virus y ensayo de tratamiento durante la infección.

a) Ensayo de tratamiento durante la infección

En este ensayo se procedió a añadir los respectivos extractos en el momento de la infección con VHSV. Para ello, se preparó una dilución del virus junto con los extractos para obtener una moi final de 0,01 y concentraciones crecientes de los extractos (5, 10, 20 y 40 $\mu\text{g/ml}$). Se añadieron las diluciones preparadas a los pocillos con las células ya crecidas y confluentes. Se paró la infección a los 7 días y se tiñó con cristal violeta. Los resultados aparecen recogidos en la **figura 10A y B**. Aparecen por separado puesto que los experimentos se realizaron independientemente.



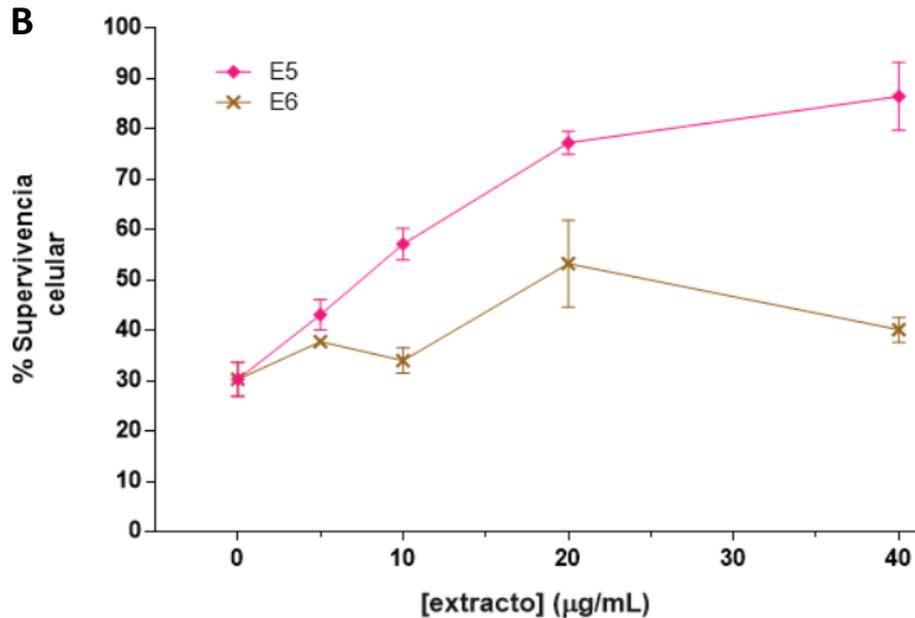


Figura 10. Inhibición de la proliferación de VHSV en EPC a una multiplicidad de infección de 0,01 por los extractos E1, E2, E3, E4 (A) y E5 y E6 (B) a concentraciones crecientes. Parada de la infección a los 7 días post infección. Las células fueron teñidas con cristal violeta seguido de una dilución con HCl 0,1M. Se midió la absorbancia a 570 nm. El porcentaje de viabilidad celular se determinó comparándolo con el control no infectado (100% viabilidad). En las gráficas se muestran las medias de los triplicados con sus correspondientes desviaciones estándar.

Se observó que los extractos que producían un mayor aumento de la supervivencia celular son E2 y E5. El extracto E2 incrementa la supervivencia celular de un 57,2% a un 78,6% a una concentración de 40 µg/ml, mientras que para el extracto E5 se observó un incremento de la supervivencia celular del 30% al 77,2% a 20 µg/ml y al 86,4% cuando se aumenta la concentración a 40 µg/ml.

Para confirmar los datos obtenidos, se realizó por segunda vez el experimento incluyendo en este caso los 6 extractos en el mismo experimento, obteniéndose los resultados que se observan en la **figura 11**.

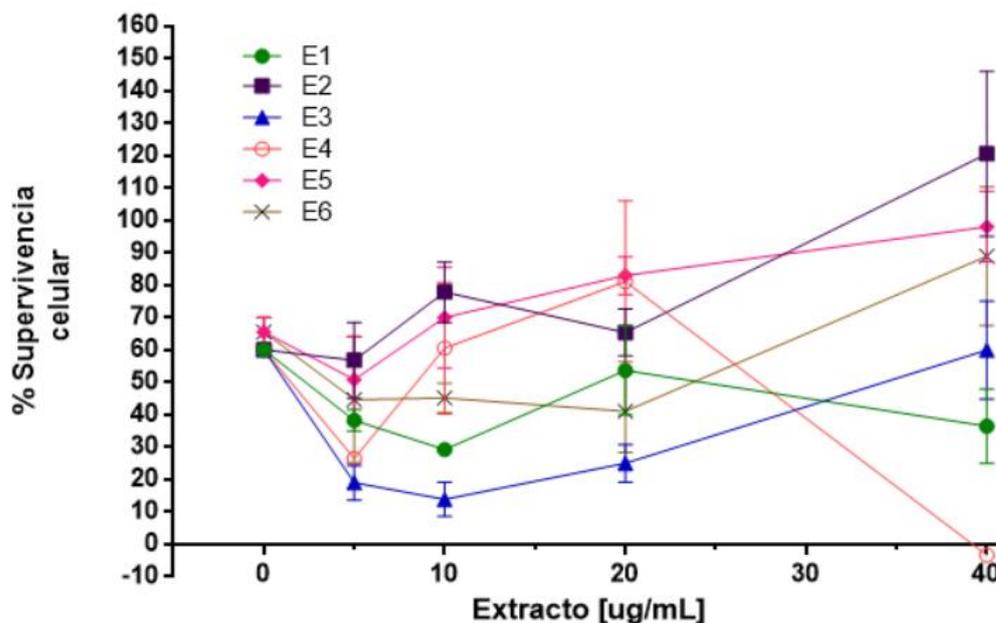


Figura 11. Inhibición de la proliferación de VHSV en EPC a una multiplicidad de infección de 0,01 por los extractos E1, E2, E3, E4, E5 y E6 a concentraciones crecientes. Parada de la infección a los 7 días post infección. Las células fueron teñidas con cristal violeta seguido de una dilución con HCl 0,1M. Se midió la absorbancia a 570 nm. El porcentaje de viabilidad celular se determinó comparándolo con el control no infectado (100% viabilidad). En las gráficas se muestran las medias de los triplicados con sus correspondientes desviaciones estándar.

A pesar de algunas diferencias, con el resultado obtenido se puede confirmar que E2 y E5 son los extractos que producen un incremento de la supervivencia celular a una concentración de 40µg/ml. Nuevamente se repite que el E4 es el más tóxico para las células a 40 µg/ml.

En algunos casos es posible que el efecto antiviral del extracto quede algo enmascarado por su toxicidad. Por ello, se decidió realizar un ensayo para determinar si se producía reducción del título de virus en presencia de los extractos. Para ello, se preparó una placa de 24 pocillos, donde se añadieron los extractos a una concentración de 20 µg/ml junto con VHSV a una moi de 0,01. Tras 6 días de infección se recogieron los sobrenadantes y se cuantificó el virus mediante una titulación por dilución límite. Los resultados obtenidos se recogen en la **figura 12**.

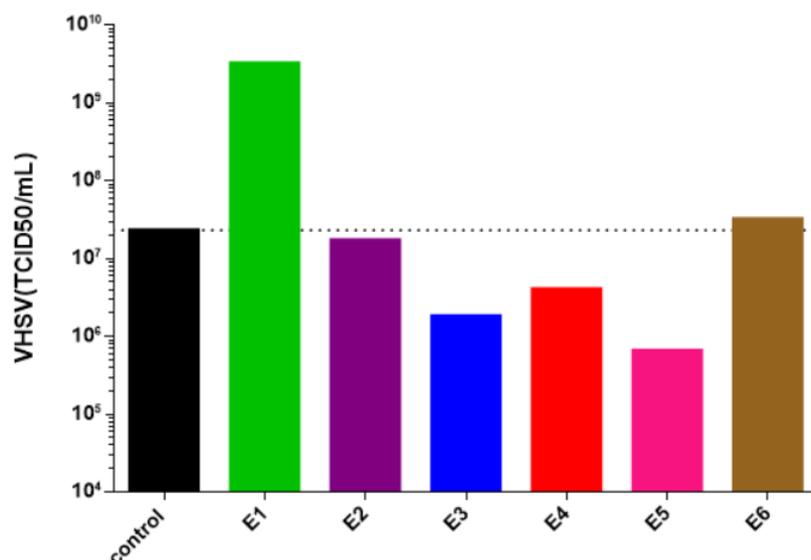


Figura 12. Efecto de los distintos extractos sobre la producción de VHSV. Células EPC fueron infectadas con VHSV a multiplicidad 0,01 en presencia de los extractos (20 µg/ml). Tras 6 dpi, se recogieron muestras de sobrenadantes y se cuantificó el virus mediante ensayo de dilución límite.

Se observó una disminución del título de VHSV para los extractos E3, E4 Y E5 con respecto al control sin extracto. El extracto E1 produce una subida del título de virus de dos órdenes de magnitud que no podemos explicar.

b) Otros ensayos de actividad antiviral

- **Ensayo de acción directa sobre el virus**

Para determinar si el extracto tenía efecto directo sobre el virus, se preparó una dilución en la que el virus estaba a una concentración superior a la concentración final deseada ($moi=0.01$), y el extracto a la concentración a la que queríamos observar el efecto (20 µg/ml). Tras dejarlo actuar durante 90 minutos, se diluyó hasta que el virus quedó a una $moi=0,01$, de tal forma que se diluye el extracto hasta una concentración a la que ya no es activo. Se paró la infección a los 6 días y se tiñó la placa con Giemsa, obteniéndose los resultados que se muestran en la **figura 13**.

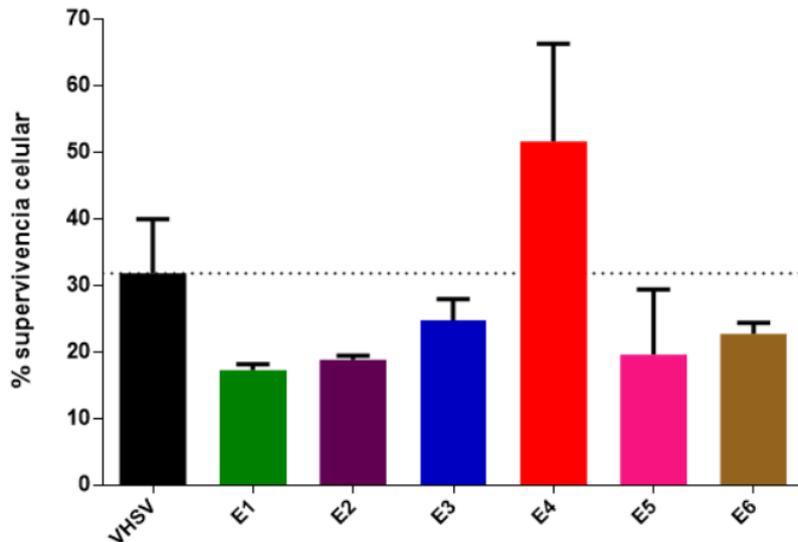


Figura 13. Inhibición de la infectividad de VHSV en células EPC con una multiplicidad de infección (moi) de 0,01 por los diferentes extractos a una concentración de 20 µg/ml. La infección se detuvo a los 6 días post infección. Las células fueron fijadas con metanol, teñidas con Giemsa y, posteriormente, disueltas en HCl. Se midió su absorbancia a 620 nm. La viabilidad celular se obtuvo tomando como control las células no infectadas (100% viabilidad).

Los resultados mostraron que a 20 µg/ml solo el extracto E4 produce un incremento de la viabilidad celular con respecto al control infectado, aumentando el porcentaje de un 31.8% a un 51.6%.

- **Ensayo de pretratamiento celular**

En el ensayo de pretratamiento, los extractos se añadieron a las células confluentes a 4 concentraciones distintas: 5, 10, 20 y 40 µg/ml. Una vez preparados los extractos, se retiró el medio de la placa y se añadieron las diluciones preparadas de los extractos. Se dejaron incubar durante 24 horas y pasado ese tiempo se infectaron las células con VHSV a una multiplicidad de infección de 0,01. Se paró la infección a los 6 días post infección. No se observó un incremento de la viabilidad celular en ninguno de los extractos (no mostrado).

4.1.3. Actividad sobre otros virus de pez

Para determinar si los extractos tenían efecto sobre otros virus, se procedió a realizar ensayos con un virus de la misma familia que VHSV (SVCV, rhabdoviridae) y otro de familia distinta (IPNV, birnaviridae).

a) Efecto sobre SVCV

- **Ensayo de tratamiento durante la infección**

Como SVCV plaquea muy bien se procedió a realizar el ensayo de tratamiento durante la infección por reducción de calvas. Para ello se añadió el virus a una moi de 0,01. Se dejó actuar durante 90 minutos y, pasado este tiempo, se retiró el virus y se añadió el extracto junto con metilcelulosa 100% en un proporción (1:1) de forma que el extracto queda a una concentración final de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y la metilcelulosa al 50%. A los 4 días post infección se paró la infección y se tiño la placa con cristal violeta. Los resultados se muestran en la **figura 14**. Se observa que en los pocillos de los extractos E1, E2, E3 y E5 hay menos efecto citopático.

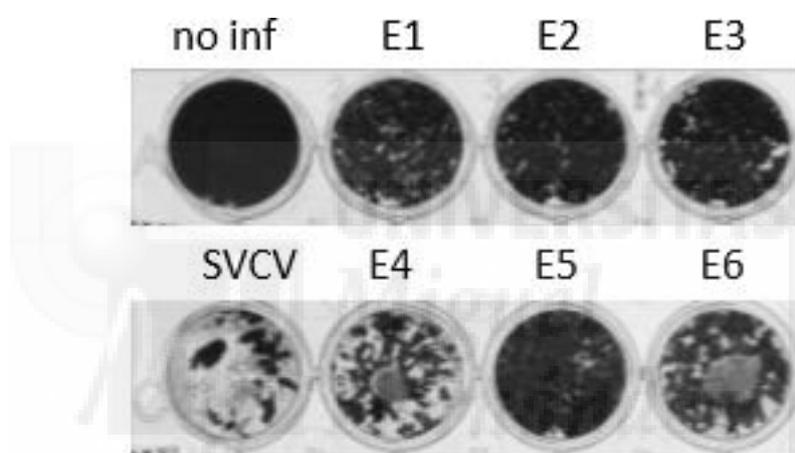


Figura 14. Inhibición de la replicación de VHSV (500 virus por pocillo) por los diferentes extractos a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en metilcelulosa al 50%. Tinción con cristal Violeta a los 4 días post infección.

- **Ensayo de acción directa sobre el virus**

Como SVCV es un virus envuelto, al igual que VHSV, se procedió a realizar el ensayo de acción directa para ver si el efecto era similar al que tenía lugar en VHSV. Se realizó por calvas, de forma que se incubó el virus junto con el extracto a 2 concentraciones distintas (20 y 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y tras 90 minutos de incubación se añadió a las células con metilcelulosa 100%. El resultado es el que se observa en la **figura 15**.

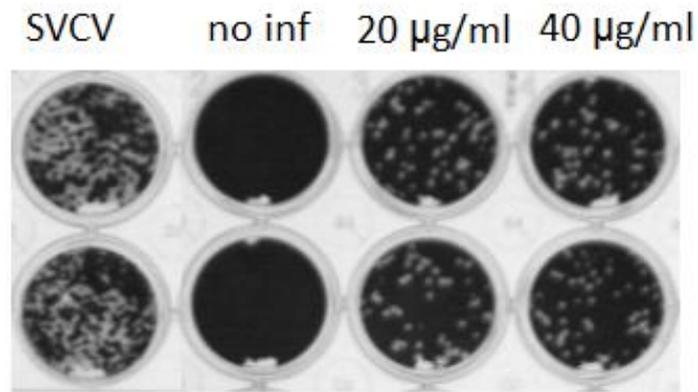


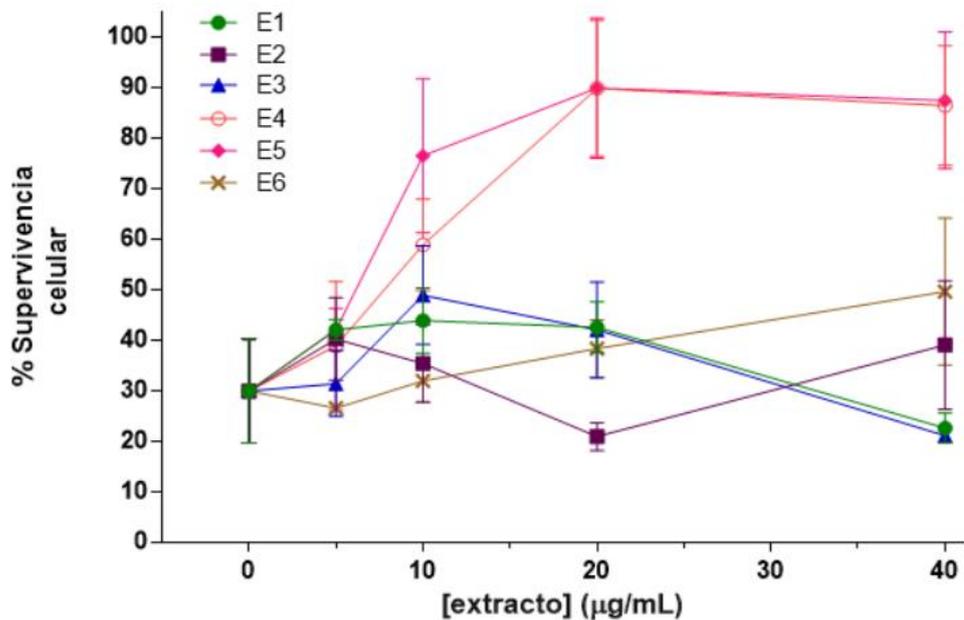
Figura 15. Inhibición de la infectividad de SVCV (100 pfu/poc) para el extracto E4 a una concentración de 20 y 40 µg/ml en metilcelulosa al 50%. Tinción con cristal Violeta a los 3 días post infección.

Se observó que para el extracto E4 el número de calvas es menor que para el control infectado, resultado que concuerda con el obtenido para VHSV.

b) Efecto sobre IPNV

Se procedió a determinar si algún extracto podría también tener efecto sobre IPNV. Para ello se realizó un ensayo de tratamiento durante la infección, ya que IPNV no hace calvas, en el que se infectaron las células confluentes con IPNV a una moi de 0,01 y, tras dejar actuar al virus durante 90 minutos, se retiró por volcado y se añadieron los extractos a distintas concentraciones finales (5, 10, 20 y 40 µg/ml). Se dejaron 5 días y, pasado este tiempo, se paró la infección y se tiñó la placa con cristal violeta. Los resultados se muestran en la **figura 16**. Se observa un incremento de la viabilidad celular con respecto al control sin infectar del 30% al 90% para los extractos E4 y E5 a partir de 20 µg/ml.

Es curioso hacer notar que en las células CHSE el extracto E4 no resulta tan tóxico como en las EPC. Al ser células de distinta especie y naturaleza es posible que la diferente composición de membrana les haga menos susceptibles al E4.



Figuras 16. Inhibición de la proliferación de IPNV en células CHSE con a una multiplicidad de infección de 0,01 por los extractos E1, E2, E3, E4, E5 y E6 a concentraciones crecientes. Parada de la infección a los 5 días post infección. Las células fueron teñidas con cristal violeta y, posteriormente, diluidas con HCl 0,1M para medir la absorbancia a 570 nm. El porcentaje de viabilidad celular se determinó comparándolo con el control no infectado (100% viabilidad). En la gráfica se muestra la media del triplicado con su correspondiente desviación estándar.

4.2. ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE CÚRCUMA

4.2.1. Cúrcuma sin filtrar

Se realizó un ensayo para comprobar si la cúrcuma tenía efecto anti-VHSV al pretratar las células o al tratarlas en el momento de la infección. Para ello, se prepararon concentraciones crecientes de cúrcuma (15, 30, 60, 120 y 240 µM) y se añadieron 100 µL por pocillo, dejándola actuar 24 horas. Pasadas las 24 horas, se retiró la cúrcuma y se añadió VHSV a una moi de 0,01. De forma paralela, en la misma placa, se realizó un ensayo de tratamiento durante la infección. Para este ensayo se prepararon diluciones de virus a una moi de 0,01 junto con la cúrcuma a las respectivas concentraciones y una vez preparadas se añadió 100 µl por pocillo a las células confluentes de la placa. A los 6 días post infección se paró la infección y se tiñó con Giemsa. Los resultados representados tanto en porcentaje de supervivencia celular como en porcentaje de protección, se muestran en la **figura 17A y B**.

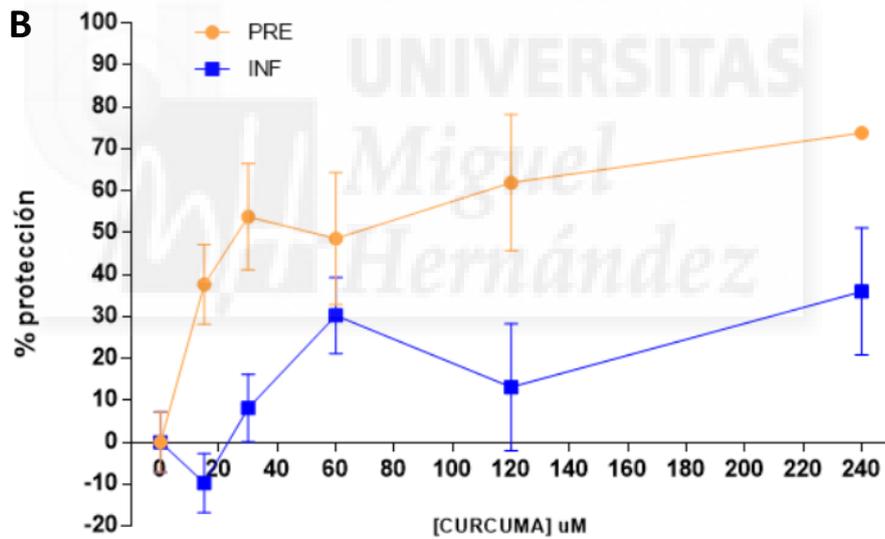
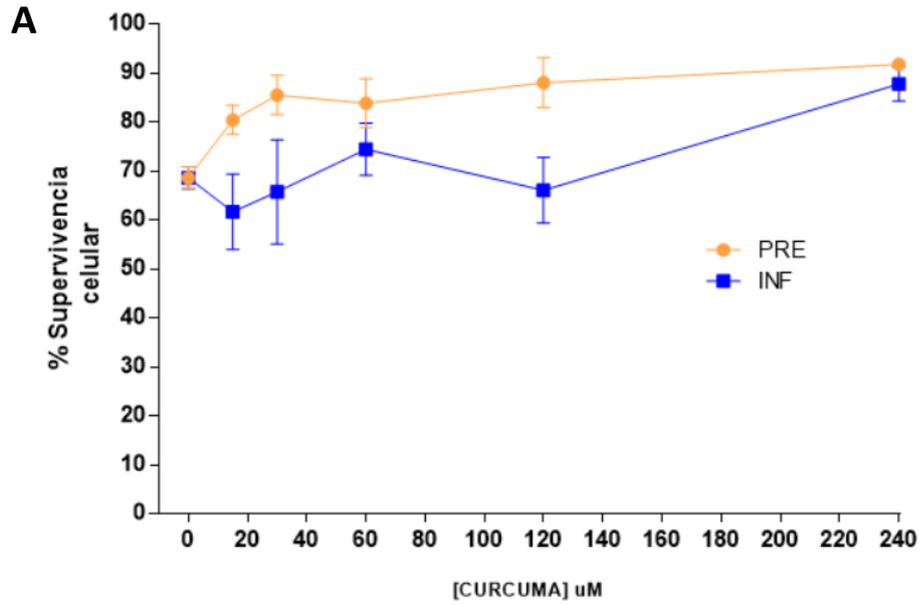


Figura 17. Inhibición de la proliferación de VHSV en EPC a una multiplicidad de infección de 0,01 por la cúrcuma a concentraciones 15, 30, 60, 120 y 240 μM al pretratar las células previamente a la infección (PRE, \circ , color naranja) o al añadir el extracto al mismo tiempo que el virus (INF, \blacksquare , color azul). Parada de la infección a los 6 días post infección. Se les añadió HCl 0,1M a las células para posteriormente medir la absorbancia en es espectrofotómetro a 620 nm. Se calculó el porcentaje de supervivencia celular considerando el 100% la media de las no infectadas (A) y el porcentaje de protección considerando la media entre infectadas y no infectadas como el 100%(B).

Según se puede observar en las gráficas, el porcentaje de supervivencia aumentó ligeramente al pretratar las células, observándose desde la concentración más baja de cúrcuma (15 μM). Solo se observa un aumento de la supervivencia cuando se trató al mismo tiempo de la infección cuando se utilizó una concentración de 240 μM . Sin embargo, el porcentaje de supervivencia celular en el control infectado es muy alto de partida, por lo que las diferencias se observan mejor tratando los datos de otra manera. Si lo observamos en base al porcentaje de protección, calculado como 100% de protección la diferencia de los valores de absorbancia entre células no infectadas e infectadas, las diferencias son más claras. Se observa un efecto dosis/respuesta mayor al pretratar las células que al tratarlas durante la infección, obteniéndose el máximo de protección en los dos casos a la concentración de 240 μM , con un 74% de protección en las células pretratadas y un 63% en las tratadas durante la infección.

4.2.2. Cúrcuma filtrada

En los ensayos con cúrcuma anteriores observamos que el stock de cúrcuma utilizado tendía a precipitar. Para evitar este problema, se procedió a preparar un nuevo stock de cúrcuma, igual que el anterior, a una concentración de 100 μM , pero esta vez seguido de un paso de filtrado.

Para ello, una vez preparado el stock, se sometió a sonicación para disgregar los grumos lo máximo posible y, posteriormente, se filtró haciéndolo pasar por un filtro de 0,45 μm .

Se procedió a realizar un ensayo MTT para determinar posible toxicidad de la cúrcuma a distintas concentraciones. Las concentraciones de cúrcuma utilizadas fueron: 20, 40, 80, 120, 180, 240 y 300 μM . Los resultados obtenidos se recogen en la **figura 18**.

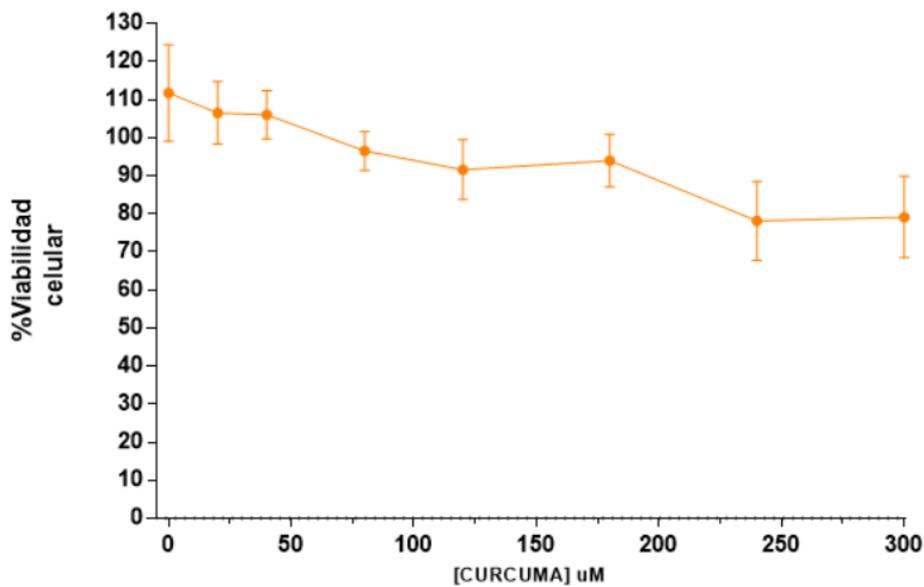


Figura 18. Ensayo de citotoxicidad MTT de cúrcuma a distintas concentraciones en la línea celular EPC tras 2 días de tratamiento. La absorbancia se midió a 570 nm y se determinó el % de viabilidad considerando las células sin tratar como control negativo (100% viabilidad).

Una vez filtrada la cúrcuma, se procedió a realizar el mismo ensayo que con la cúrcuma sin filtrar, pero en este caso con la cúrcuma filtrada, a concentraciones crecientes de hasta 600 µM. Los resultados mostraron que el tratamiento con cúrcuma filtrada no incrementaba la supervivencia células ni el % de protección (no se muestra).

5. Discusión

La amenaza de las enfermedades víricas en el sector acuícola es considerado un tema relevante, como en el resto de actividades intensivas, debido a las pérdidas económicas que conlleva. Hasta la fecha, se han descubierto un gran número de enfermedades víricas que afectan a la industria acuícola (Biering, Villoing et al. 2005). En particular, el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV), que es el más estudiado en este trabajo, es considerado uno de los virus más importantes que afectan a la acuicultura europea, causando pérdidas de alrededor de 40 millones de libras por año (Hill 1992). La septicemia hemorrágica viral es una enfermedad de declaración obligada (EOI 2015).

Para controlar las infecciones víricas en peces se han desarrollado algunos tipos de vacunas, así como terapias con diferentes tipos de compuestos. Los extractos vegetales son una fuente muy amplia de compuestos antivirales. En las últimas décadas, un gran número de fitoquímicos han sido reconocidos como compuestos capaces de controlar las infecciones causadas por virus (Abad, Guerra et al. 2000).

Siguiendo en la línea de trabajo citada anteriormente, buscando compuestos de origen vegetal con actividad antiviral, en el presente trabajo se ha tratado de identificar si ciertos compuestos de origen vegetal tienen actividad frente a algunos virus de peces, en concreto la cúrcuma y diferentes extractos de *Cistus*.

5.1. EXTRACTOS DE PLANTAS DEL GÉNERO *CISTUS*

En estudios previos se había determinado la capacidad antiviral de los extractos de *Cistus* frente al virus de la gripe (Ehrhardt, Hrincius et al. 2007), con lo que estábamos interesados en determinar si también afectaba a virus de importancia en acuicultura, como son VHSV, SVCV e IPNV, virus que infectan a diferentes especies, como son la trucha, el salmón y la carpa, de alto valor económico.

Se probaron seis extractos a ciegas, nombrados del E1 al E6. Se observó que al añadir los extractos E2 y E5 durante el periodo de infección de células EPC con VHSV, a

una concentración de 40 µg/ml, el porcentaje de supervivencia celular aumentaba con respecto al control sin extracto en un 22 y un 56%, respectivamente. De estos resultados se dedujo que estos extractos tienen cierto efecto inhibitor sobre VHSV, inhibiendo la replicación, lo que conlleva una menor producción de partículas víricas y, por ello, una menor capacidad de infección, manifestándose en una mayor supervivencia celular. Para poder determinar si el número de partículas virales decrecía se titularon sobrenadantes de VHSV de las células tratadas con los diferentes extractos a una concentración de 20µg/ml. El menor título se observó para el extracto E5, seguido de los extractos E3 y E4, respectivamente, con un título de 10⁶. Esto supone un orden de magnitud menos con respecto al control, que obtuvo un título de 10⁷. Se esperaba, por los resultados del experimento anterior, que se obtuviese un menor título para E2, ya que el porcentaje de supervivencia celular era mayor. Sin embargo, a diferencia de E5 que sí presentó un título más bajo, para E2 no ocurrió lo mismo. Esta discrepancia se puede explicar porque ambos ensayos no miden exactamente los mismos parámetros. Al calcular el porcentaje de supervivencia celular se tiene en cuenta, además de actividad antiviral, la citotoxicidad de los extractos, mientras que en la titulación se mide únicamente actividad antiviral. Además, la titulación se realizó a 20 µg/ml, concentración a la cual en el ensayo de tratamiento durante infección se obtuvo para E3 y E2 un porcentaje de supervivencia celular similar.

Con el fin de determinar si algún extracto producía efecto a nivel celular o a nivel de partícula viral, se realizaron otros dos tipos de ensayo: pretratamiento celular y tratamiento del virus. En el primero de ellos no se observó el efecto de ningún extracto, a diferencia de los resultados obtenidos en otros estudios para el extracto de olivo (Micol, Caturla et al. 2005), en el que se obtuvo una reducción del porcentaje de infectividad de VHSV del 62% cuando se pretrataban células EPC. Se descartó, por tanto, que alguno de ellos dotase a la célula de cierta capacidad para combatir al virus. En el segundo caso, al preincubar el virus con cada uno de los seis extractos, se observó un incremento en el porcentaje de supervivencia celular del 20% cuando se incubó VHSV junto con el extracto E4 a una concentración de 20 µg/ml. De estos resultados se dedujo que E4 tenía capacidad virucida, esto es, que tiene un efecto directo sobre las partículas

del virus, causándoles un daño que disminuye su capacidad de infectar células. El hecho de que E4 tenga capacidad de dañar la membrana explicaría su considerable toxicidad.

Es típico de los extractos vegetales que tengan un amplio espectro de acción, por ello se decidió realizar los mismos ensayos para otros virus: SVCV. Al tratar células infectadas con SVCV con los diferentes extractos, a una concentración de 20 µg/ml, en un ensayo de calvas se observó que el efecto citopático era menor en los extractos E1, E2, E3 y E5 que en el control infectado, sugiriendo que los extractos también tienen capacidad inhibitoria de la replicación de SVCV. Sería necesario realizar más experimentos para llegar a una conclusión definitiva, pero nuestros resultados sugieren que E2 y E5 tienen capacidad de inhibir rhabdovirus.

Para SVCV, se obtuvo un menor efecto citopático con respecto con control infectado cuando se añadieron los extractos E1, E2, E3 y E5 a 20 µg/ml durante el periodo de infección, lo que sugiere que estos extractos pueden tener cierto efecto sobre la replicación de SVCV. Además, se observó que el efecto citopático era menor también cuando se trataban las células con el virus previamente incubado con el extracto E4 a una concentración de 20 µg/ml, indicando que E4 podría tener actividad virucida, al igual que frente a VHSV, frente SVCV.

Puesto que tanto VHSV como SVCV son Rhabdovirus, quisimos estudiar el efecto sobre otro virus perteneciente a otra familia: IPNV (Birnavirus). En el caso de IPNV, con el cual se realizó un ensayo donde se calculó el porcentaje de supervivencia celular, se observó que la supervivencia aumentó a un 90% cuando se trataba con los extractos E4 y E5 a una concentración de 20 µg/ml, sugiriendo que estos dos extractos pueden tener cierta capacidad de inhibición de la replicación de IPNV.

Finalizada la parte experimental de este trabajo, nos revelaron el origen y la composición de los extractos que presentaron mejor actividad antiviral: E2, E4 y E5. Los extractos E2 y E5, los cuales presentaron actividad al tratar las células durante la infección, eran un extracto cetónico de la especie *Thymus moroderi* (cantueso) y un extracto hidroalcohólico de *Cistus albidus*, respectivamente. Entre los componentes mayoritarios de ambos extractos se encuentran la catequina y la quercetina (Tomas-Menor, Morales-Soto et al. 2013). Por otro lado, el extracto E4, para el cual se observó

actividad virucida, se correspondía con la fracción polifenólica de un extracto acuoso de *Cistus salviifolius*.

Estudios anteriores revelaron que al añadir catequina durante la infección, se observaba en células infectadas un efecto inhibitorio del virus de la gastroenteritis transmisible, un coronavirus (Liang, He et al. 2015). También se ha estudiado con anterioridad la capacidad antiviral de la quercetina (Chio, Phoon et al. 2016). En este estudio, al tratar células infectadas con el virus de la hepatitis de ratón y con el virus del dengue, se observó una inhibición de la proliferación viral. Estos trabajos tienen en común con nuestro estudio que todos los virus tienen genoma de RNA de cadena sencilla y, además, que son virus envueltos. Esto apoya la idea de que, tanto la catequina como la quercetina tienen algún efecto sobre la replicación de virus con genoma RNA de cadena sencilla y con envoltura, como VHSV o SVCV.

Además, E2 y E5 tienen otro componente común, aunque en menor concentración que los anteriores: los flavonoides. También se ha descrito con anterioridad (Kang, Kang et al. 2012) la capacidad antiviral de los flavonoides procedentes de *Rhus verniciflua* frente a VHSV e IHN, virus envueltos de genoma de RNA de cadena sencilla. En el citado estudio se sugiere que los flavonoides pueden ejercer su efecto antiviral induciendo la apoptosis de células infectadas, siguiendo la línea de estudios previos en los que se había demostrado que los flavonoides inducían la apoptosis de diferentes líneas celulares de cáncer (Jang, Kook et al. 2005) (Ying, Yang et al. 2012). Si la inducción de apoptosis en la célula fuera el mecanismo de acción de E2 o E5, esto concuerda con que no se observe efecto virucida, y que únicamente se manifieste efecto cuando se trata con el extracto durante el periodo de infección. Además, también se sugiere que puede ser el grupo OH del carbono 3, común en todos los flavonoides, el responsable de su capacidad antiviral, como ya se había descrito anteriormente para el virus de la mieloblastosis aviar (Inouye, Yamaguchi et al. 1989), en el cual los flavonoides inhiben su transcriptasa inversa.

En cuanto al E4, que no es un extracto completo, sino sólo la fracción polifenólica, los resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios de compuestos polifenólicos, en los que se describe la actividad virucida de estos. Es el

caso del trabajo realizado por Lee JH y cols (Lee, Oh et al. 2016) dónde se describe que uno de los polifenoles presentes en la especie *Rubus coreanus* presenta efecto inhibitorio del virus de la gripe; y el estudio realizado por Calland N y cols (Calland, Sahuc et al. 2015), donde se describe la capacidad antiviral de un polifenol de origen natural, la delfinidina. Además, en este último artículo se sugiere la delfinidina actúa directamente sobre la partícula viral, induciendo deformaciones a modo de "hinchazones" en la membrana del virus.

5.2. CÚRCUMA

Está descrito que la cúrcuma tiene actividad antiviral frente a diferentes virus con envoltura (Chen, Chen et al. 2013) y, específicamente, frente a VHSV (Jeong, Vaidya et al. 2015).

Al realizar el ensayo de pretratamiento celular con cúrcuma sin filtrar se observó un incremento del 23,2% en términos de viabilidad y de un 73,8% en términos de protección, a una concentración de 240 μ M. Estos datos coinciden con los obtenidos en estudios previos (Chen, Chen et al. 2013), dónde se obtuvo un porcentaje de viabilidad mayor del 90% cuando se pretrataban las células con cúrcuma en un rango de concentraciones entre 15 y 120 μ M, recuperando el 100% de viabilidad a los 120 μ M. Estos resultados sugieren que el pretratamiento con cúrcuma es capaz de inducir algún tipo de estado antiviral en las células, de forma que se produce una reducción de la replicación de VHSV. Esto tendría interesantes implicaciones prácticas de funcionar in vivo, ya que al administrárselo a los peces les haría más resistentes a posteriores infecciones con VHSV.

Al añadir la cúrcuma durante el periodo de infección, se observa un incremento de la viabilidad al 90% a una concentración de 240 μ M, con lo que sí tiene cierto efecto antiviral, pero es menor que el que se produce cuando se pretratan las células. Estos resultados coinciden con estudios previos (Jeong, Vaidya et al. 2015) en los que se describe que el pretratamiento con cúrcuma incrementa la viabilidad celular de células infectadas con VHSV de forma directamente proporcional a la concentración y que este efecto es mucho menor cuando se añade la cúrcuma una vez que se ha producido la

entrada viral. Los resultados en ambos casos muestran la mayor actividad en el rango de 100 a 300 μM . Además, en un estudio realizado en Chen Tzu-Yen (Chen, Chen et al. 2013), se comparó el efecto antiviral de la cúrcuma sobre virus envueltos y sobre virus no envueltos, obteniendo efecto antiviral sólo en aquellas células infectadas con virus envueltos. Una posibilidad es que la cúrcuma interaccione con las proteínas de membrana del virus, pero esto es sólo una hipótesis.

Durante la realización de los ensayos con cúrcuma se observó que la disolución stock no se mantenía homogénea y que tendía a precipitar, por lo que se decidió filtrarla. Al filtrarla, se comprobó que no era tóxica en el rango de concentraciones entre 0 y 300 μM , pero al realizar el ensayo de actividad anti-VHSV no se obtuvo actividad de la cúrcuma incluso a concentraciones de 600 μM . Esto podría ser debido a que hay pérdidas de material que queda retenido en el filtro.



6. Conclusiones y perspectivas futuras

Las conclusiones que se pueden obtener a raíz de este trabajo son las siguientes:

1. Los extractos E2 (de *Thymus*) y E5 (de *Cistus*) inhiben algún paso del ciclo de replicación viral de VHSV.
2. El extracto E4 tiene actividad directa sobre la partícula viral de VHSV y SVCV.
3. Los extractos E4 y E5 inhiben virus de dos familias distintas, con lo que podrían tener amplio espectro de acción.
4. El preparado no filtrado de cúrcuma induce en las células EPC protección frente a VHSV.

En cuanto a los pasos futuros de este estudio sería precisar la concentración inhibitoria 50% (IC50) de los compuestos con mayor efecto anti-VHSV: E2, E4, E5 y cúrcuma, así como comprobar posibles sinergias entre compuestos. En cuanto a los extractos E2 y E5, determinar la actividad antiviral de algunos de sus componentes mayoritarios (catequina, quercetina). El siguiente avance sería determinar el mecanismo de acción de los extractos sobre VHSV así como evaluar la posibilidad de su empleo *in vivo*, en el modelo de pez cebra.

Bibliografía

1. **Abad, M. J.**, J. A. Guerra, P. Bermejo, A. Irurzun and L. Carrasco (2000). "Search for antiviral activity in higher plant extracts." *Phytother Res* **14**(8): 604-607.
2. **Biering, E.**, S. Villoing, I. Sommerset and K. E. Christie (2005). "Update on viral vaccines for fish." *Dev Biol (Basel)* **121**: 97-113.
3. **Brudeseth, B. E.**, R. Wiulstrod, B. N. Fredriksen, K. Lindmo, K. E. Lokling, M. Bordevik, N. Steine, A. Klevan and K. Gravningen (2013). "Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming." *Fish Shellfish Immunol* **35**(6): 1759-1768.
4. **Calland, N.**, M. E. Sahuc, S. Belouzard, V. Pene, P. Bonnafous, A. A. Mesalam, G. Deloison, V. Descamps, S. Sahpaz, C. Wychowski, O. Lambert, P. Brodin, G. Duverlie, P. Meuleman, A. R. Rosenberg, J. Dubuisson, Y. Rouille and K. Seron (2015). "Polyphenols Inhibit Hepatitis C Virus Entry by a New Mechanism of Action." *J Virol* **89**(19): 10053-10063.
5. **Chang, S. J.**, S. H. Huang, Y. J. Lin, Y. Y. Tsou and C. W. Lin (2014). "Antiviral activity of *Rheum palmatum* methanol extract and chrysophanol against Japanese encephalitis virus." *Arch Pharm Res* **37**(9): 1117-1123.
6. **Chen, T. Y.**, D. Y. Chen, H. W. Wen, J. L. Ou, S. S. Chiou, J. M. Chen, M. L. Wong and W. L. Hsu (2013). "Inhibition of enveloped viruses infectivity by curcumin." *PLoS One* **8**(5): e62482.
7. **Chiw, K. H.**, M. C. Phoon, T. Putti, B. K. Tan and V. T. Chow (2016). "Evaluation of antiviral activities of *Houttuynia cordata* Thunb. extract, quercetin, quercetrin and cinanserin on murine coronavirus and dengue virus infection." *Asian Pac J Trop Med* **9**(1): 1-7.
8. **Ehrhardt, C.**, E. R. Hrinčius, V. Korte, I. Mazur, K. Droebner, A. Poetter, S. Dreschers, M. Schmolke, O. Planz and S. Ludwig (2007). "A polyphenol rich plant extract, CYSTUS052, exerts anti influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance." *Antiviral Res* **76**(1): 38-47.
9. **EOI** (2015). "Viremia primavera de la carpa. Manual de las Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos."
10. **FAO**, F. a. A. O. o. t. U. N. (2015). "La Acuicultura en España."
11. **Gomez-Casado, E.**, A. Estepa and J. M. Coll (2011). "A comparative review on European-farmed finfish RNA viruses and their vaccines." *Vaccine* **29**(15): 2657-2671.
12. **Hill, B.** (1992). "Impact of viral diseases on salmonid fish in Europe." *Proceedings of the OJI International symposium on salmonid diseases.*
13. **Hudson, J. B.**, E. A. Graham and M. F. Simpson (1988). "The efficacy of amantadine and other antiviral compounds against two salmonid viruses in vitro." *Antiviral Res* **9**(6): 379-385.
14. **Inouye, Y.**, K. Yamaguchi, Y. Take and S. Nakamura (1989). "Inhibition of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase by flavones and isoflavones." *J Antibiot (Tokyo)* **42**(10): 1523-1525.
15. **Jang, H. S.**, S. H. Kook, Y. O. Son, J. G. Kim, Y. M. Jeon, Y. S. Jang, K. C. Choi, J. Kim, S. K. Han, K. Y. Lee, B. K. Park, N. P. Cho and J. C. Lee (2005). "Flavonoids purified from *Rhus*

- verniciiflua Stokes actively inhibit cell growth and induce apoptosis in human osteosarcoma cells." Biochim Biophys Acta **1726**(3): 309-316.*
16. **Jeong, E. H.**, B. Vaidya, S. Y. Cho, M. A. Park, K. Kaewintajuk, S. R. Kim, M. J. Oh, J. S. Choi, J. Kwon and D. Kim (2015). "*Identification of regulators of the early stage of viral hemorrhagic septicemia virus infection during curcumin treatment.*" Fish Shellfish Immunol **45**(1): 184-193.
 17. **Kamei, Y.** and M. Aoki (2007). "*A chlorophyll c2 analogue from the marine brown alga Eisenia bicyclis inactivates the infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus.*" Arch Virol **152**(5): 861-869.
 18. **Kang, S. Y.**, J. Y. Kang and M. J. Oh (2012). "*Antiviral activities of flavonoids isolated from the bark of Rhus verniciiflua stokes against fish pathogenic viruses In Vitro.*" J Microbiol **50**(2): 293-300.
 19. **Kim, S. Y.**, S. R. Kim, M. J. Oh, S. J. Jung and S. Y. Kang (2011). "*In vitro antiviral activity of red alga, Polysiphonia morrowii extract and its bromophenols against fish pathogenic infectious hematopoietic necrosis virus and infectious pancreatic necrosis virus.*" J Microbiol **49**(1): 102-106.
 20. **LaPatra, S. E. L.**, K.A. (1998). "*Resistance to IHN virus infection in rainbow trout is increased by glucan while subsequent production of serum neutralizing activity is decreased*".
 21. **Lee, J. H.**, M. Oh, J. H. Seok, S. Kim, D. B. Lee, G. Bae, H. I. Bae, S. Y. Bae, Y. M. Hong, S. O. Kwon, D. H. Lee, C. S. Song, J. Y. Mun, M. S. Chung and K. H. Kim (2016). "*Antiviral Effects of Black Raspberry (Rubus coreanus) Seed and Its Gallic Acid against Influenza Virus Infection.*" Viruses **8**(6).
 22. **Liang, W.**, L. He, P. Ning, J. Lin, H. Li, Z. Lin, K. Kang and Y. Zhang (2015). "*(+)-Catechin inhibition of transmissible gastroenteritis coronavirus in swine testicular cells is involved its antioxidation.*" Res Vet Sci **103**: 28-33.
 23. **Marroqui, L.**, A. Estepa and L. Perez (2007). "*Assessment of the inhibitory effect of ribavirin on the rainbow trout rhabdovirus VHSV by real-time reverse-transcription PCR.*" Vet Microbiol **122**(1-2): 52-60.
 24. **Marroqui, L.**, A. Estepa and L. Perez (2008). "*Inhibitory effect of mycophenolic acid on the replication of infectious pancreatic necrosis virus and viral hemorrhagic septicemia virus.*" Antiviral Res **80**(3): 332-338.
 25. **Micol, V.**, N. Caturla, L. Perez-Fons, V. Mas, L. Perez and A. Estepa (2005). "*The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV).*" Antiviral Res **66**(2-3): 129-136.
 26. **Rivas-Aravena, A.**, E. Vallejos-Vidal, M. Cortez-San Martin, F. Reyes-Lopez, M. Tello, P. Mora, A. M. Sandino and E. Spencer (2011). "*Inhibitory effect of a nucleotide analog on infectious salmon anemia virus infection.*" J Virol **85**(16): 8037-8045.
 27. **Tomas-Menor, L.**, A. Morales-Soto, E. Barrajon-Catalan, C. Roldan-Segura, A. Segura-Carretero and V. Micol (2013). "*Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish Cistus species.*" Food Chem Toxicol **55**: 313-322.
 28. **von Rhein, C.**, T. Weidner, L. Henss, J. Martin, C. Weber, K. Sliva and B. S. Schnierle (2016). "*Curcumin and Boswellia serrata gum resin extract inhibit chikungunya and vesicular stomatitis virus infections in vitro.*" Antiviral Res **125**: 51-57.

29. **Ying, T. H.**, S. F. Yang, S. J. Tsai, S. C. Hsieh, Y. C. Huang, D. T. Bau and Y. H. Hsieh (2012). "*Fisetin induces apoptosis in human cervical cancer HeLa cells through ERK1/2-mediated activation of caspase-8-/caspase-3-dependent pathway.*" *Arch Toxicol* **86**(2): 263-273.

