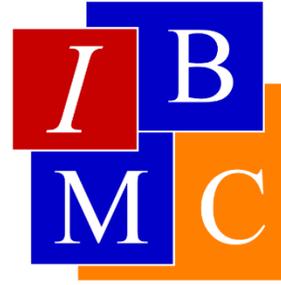




Universidad Miguel Hernández de Elche



Instituto de Biología Molecular y Celular

# Fenómenos de interferencia viral en células de cipriniformes y perciformes, dos grupos de peces de importancia en acuicultura

Helena Codina Márquez

Tutor: Luis Pérez García-Estañ

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Área de virología

Grado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Experimentales

Curso académico 2016/2017

# ÍNDICE

---

<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....</b>	<b>3</b>
<b>RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.....</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5-8</b>
1. Situación actual de la acuicultura.....	5-6
2. Infecciones víricas: persistencia e interferencia viral.....	6
3. Virus de importancia acuícola.....	6-7
4. Resistencia a infecciones víricas: respuesta inmune innata.....	7-8
<b>ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>10-16</b>
<b>1. Cultivos celulares.....</b>	<b>10-11</b>
1.1 Medios de cultivo.....	10
1.2 Líneas celulares.....	11
<b>2. Virus e infecciones.....</b>	<b>12</b>
2.1 Virus usados.....	12
2.2 Técnicas de infección.....	12
<b>3. Sistema de co-cultivo Transwell®.....</b>	<b>12-13</b>
<b>4. Tinciones.....</b>	<b>13</b>
4.1 Tinción con cristal violeta.....	13
4.2 Tinción con Giemsa.....	13
<b>5. Medidas de densidad óptica y microscopía de campo claro.....</b>	<b>14</b>
5.1 Medidas de densidad óptica.....	14
5.2 Microscopía de campo claro.....	14
<b>6. Tratamiento de ácidos nucleicos.....</b>	<b>14-16</b>
6.1 Diseño de cebadores para PCR cuantitativa.....	14
6.2 Extracción de RNA.....	14-15
6.3 Síntesis de cDNA (retrotranscripción).....	15
6.4 PCR cuantitativa o PCR en tiempo real.....	15-16
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>17-31</b>
<b>1. Resistencia de EPC<sup>IPNV</sup> y SAF<sup>IPNV</sup> a VHSV.....</b>	<b>17-21</b>
1.1 Establecimiento de líneas celulares persistentemente infectadas con IPNV.....	17
1.2 Resistencia de EPC <sup>IPNV</sup> a VHSV.....	17-18
1.3 Resistencia de SAF <sup>IPNV</sup> a VHSV.....	18-19
1.4 Resistencia de EPC <sup>IPNV</sup> a IPNV-LWVRT60 y VHSV.....	19-21
<b>2. Dependencia de la interferencia viral de IPNV.....</b>	<b>21-24</b>
2.1 Experimentos de subida de temperatura (shift-up).....	21
2.2 Efecto de la subida de temperatura sobre la resistencia de EPC <sup>IPNV</sup> a VHSV.....	21-22
2.3 Efecto de la subida de temperatura sobre la resistencia SAF <sup>IPNV</sup> a VHSV.....	22-23
2.4 Estudio de la expresión de IPNV en SAF <sup>IPNV</sup> con dos y tres pases a 25°C.....	23-24

<b>3. Actividad antiviral de medios condicionados de líneas persistentemente infectadas..</b>	<b>24-28</b>
3.1 Actividad de medios condicionados de EPC <sup>IPNV</sup> y SAF <sup>FIPNV</sup> sobre EPC.....	24-27
3.2 Actividad de medios condicionados de EPC <sup>IPNV</sup> y SAF <sup>FIPNV</sup> sobre SAF.....	27-28
<b>4. Análisis de la interferencia viral en el sistema de co-cultivo Transwell®.....</b>	<b>29-30</b>
<b>5. Análisis de la expresión de genes de resistencia en EPC<sup>IPNV</sup> y SAF<sup>FIPNV</sup> .....</b>	<b>30-31</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>32-36</b>
1. Relación entre la infección persistente de IPNV y la resistencia a VHSV.....	32-33
2. Caracterización de la línea celular EPC <sup>IPNV</sup> .....	33
3. Análisis de la resistencia inducida por cultivos persistentemente infectados con IPNV.	34-36
<b>CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA.....</b>	<b>37</b>
<b>REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>38-39</b>

# ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

---

En este trabajo se han usado diversas abreviaturas y acrónimos. Cada uno de ellos se define la primera vez que se ha usado en la memoria:

**EPC:** *Epitelioma Popullosum Cyprini* (células epiteliales de carpa)

**EPC<sup>IPNV</sup>:** Células EPC con infección persistente de IPNV

**EPC<sup>IPNV-LW</sup>:** Células EPC con infección persistente de IPNV cepa LW

**SAF:** *Sparus Aurata Fibroblast* (células fibroblásticas de dorada)

**SAF<sup>IPNV</sup>:** Células SAF con infección persistente de IPNV

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**cDNA:** Ácido desoxirribonucleico complementario

**RNA:** Ácido ribonucleico

**mRNA:** Ácido ribonucleico mensajero

**rRNA:** Ácido ribonucleico ribosómico

**dNTPs:** Desoxinucleótidos trifosfato

**DTT:** Ditioneitol

**VHSV:** Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral

**SVCV:** Virus de la Viremia Primavera de Carpa

**IPNV:** Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa

**IHNV:** Virus de la Necrosis Hematopoyética Infecciosa

**Moi:** Multiplicidad de infección

**d.p.i:** Días post infección

**TRK:** Tampón de lisis

**18S:** RNA ribosómico 18S

**Rt:** retrotranscripción

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**qPCR:** PCR cuantitativa

**Rt-qPCR:** PCR cuantitativa con transcripción inversa

## RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

---

Estudios previos con la línea celular EPC de carpa (cipriniformes), persistentemente infectada con IPNV (EPC<sup>IPNV</sup>), mostraron que dicha línea es resistente a la infección por virus heterólogos, como VHSV, y que secreta al medio factores con actividad antiviral. En el presente trabajo se perseguía obtener una línea celular persistentemente infectada con IPNV de un grupo distinto de peces (perciformes) y para ello se utilizó una línea celular de dorada (SAF<sup>IPNV</sup>). Se comprobó que sus características son similares a las de EPC<sup>IPNV</sup> en cuanto a resistencia a superinfección con VHSV, si bien es una línea menos estable. Además se ha constatado la presencia de factores antivirales en los medios condicionados de EPC<sup>IPNV</sup> y SAF<sup>IPNV</sup> que inducen resistencia a la infección con VHSV. El análisis por PCR cuantitativa indicó que es probable que la expresión gen *mx*, inducido por Interferón, pueda tener un papel en el establecimiento del estado antiviral, posiblemente como resultado de la activación de las vías de señalización de Interferón tipo I. Estos estudios permiten profundizar en los mecanismos de la respuesta inmune innata, lo que podría contribuir a la creación y mejora de vacunas frente a virus de peces.

**Palabras clave:** virus de pez, persistencia, interferencia viral, respuesta inmune innata.

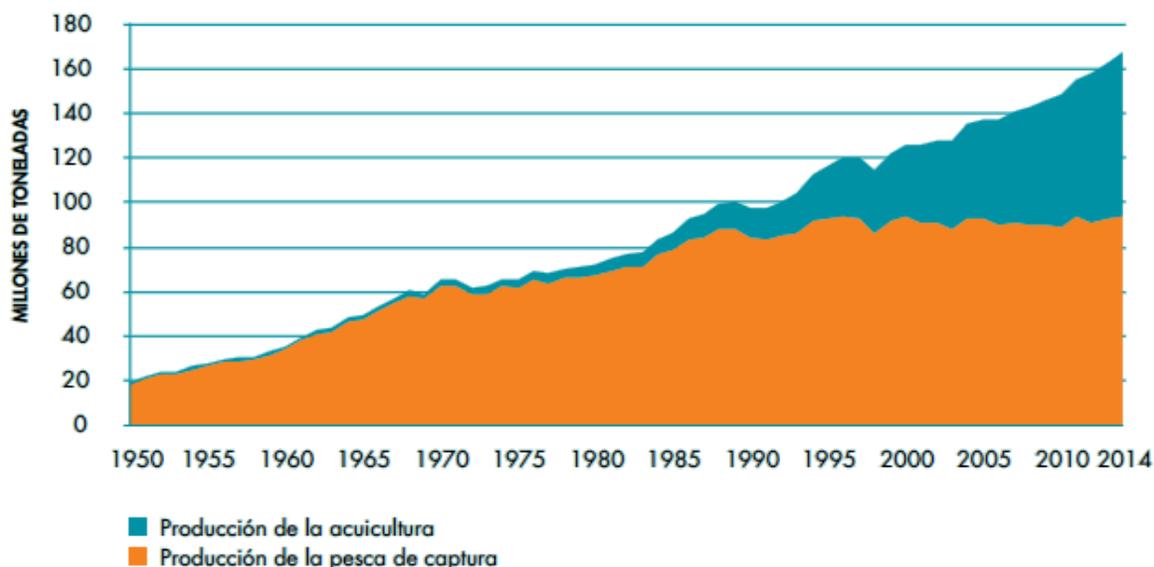
Previous studies with the cell line EPC from carp (cyprinid), persistently infected with IPNV (EPC<sup>IPNV</sup>), revealed that this line is resistant to heterologous viruses infection, such as VHSV, and that these cells secrete factors with antiviral activity. In this project, the objective was to obtain another cell line persistently infected with IPNV from a different group of fish. To do that, a cell line from gilthead sea bream (perciform) was used (SAF<sup>IPNV</sup>). It was found that, although this line is less stable, its behavior related to VHSV superinfection resistance is similar to those from EPC<sup>IPNV</sup>. Moreover, here we show experimental evidence of the presence of antiviral factors in the supernatant of EPC<sup>IPNV</sup> y SAF<sup>IPNV</sup> cultures that induce resistance to VHSV infection. Quantitative PCR analysis pointed that *mx* gene, induced by Interferon, could play a role in the establishment of the antiviral state, possibly through the Interferon type I system. This studies help understand the innate immune response mechanisms, which would contribute to the development and improvement of vaccines against fish viruses'.

**Keywords:** Fishes viruses', persistency, viral interference, innate immune response.

# INTRODUCCIÓN

## 1. Situación actual de la acuicultura

El pescado es uno de los productos alimenticios básicos más comercializado mundialmente. De hecho, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en los últimos años el consumo anual *per capita* ha ido aumentando, hasta llegar en 2016 a un máximo de 20kg. Este aumento constante ha provocado que la pesca de captura sea incapaz de cubrir la demanda mundial de pescado y por este motivo, durante las últimas décadas se ha invertido un gran capital en acuicultura. En 2014 se alcanzó un hito en este campo cuando la cantidad de pescado para el consumo humano procedente de acuicultura superó por primera vez la del pescado capturado en el medio natural (**Figura 1**), alcanzando una producción de 73,8 millones de toneladas.



**Figura 1.** Evolución de la producción de acuicultura y pesca mundial desde 1950 hasta 2014 (FAO 2016, El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016.).

Pese a estos datos tan favorables, la industria de la acuicultura ve comprometida su producción por enfermedades de origen bacteriano y vírico (estas últimas, particularmente difíciles de controlar). Un ejemplo del daño que causan los virus en acuicultura, es el brote

del Virus de la Anemia Infecciosa de Salmón (ISAV) en Chile en el año 2007. Este país, que es el segundo productor mundial de salmones, detrás de Noruega, sufrió la pérdida del 50% de la producción anual (400.000 toneladas) debido a la infección de los peces con dicho virus. Por tanto, las infecciones víricas son una importante amenaza para la industria piscícola y de ahí el creciente interés en investigar las bases moleculares del proceso infectivo en peces, su sistema inmune y el desarrollo de agentes terapéuticos efectivos que puedan combatir estas infecciones.

## ***2. Infecciones víricas: persistencia e interferencia viral***

Generalmente, las infecciones víricas se propagan rápidamente entre los peces de una población. En algunos casos, dependiendo del virus y del pez, una vez pasada la infección los peces pueden convertirse en portadores del virus e infectar a otros peces (L. M. Bootland *et al.*, 1991; A. E. Goodwin *et al.*, 2012). Normalmente, estos peces portadores se vuelven inmunes a infecciones posteriores del mismo virus y en muy raras ocasiones adquieren resistencia a infecciones de virus distintos. Este fenómeno puede simularse *in vitro* mediante el establecimiento de una infección persistente en una línea celular (N. Ballesteros *et al.*, 2015; S. R. Saint-Jean *et al.*, 2010). Se entiende por infección persistente, una infección en la que existe una producción continua de virus sin que las células hospedadoras mueran. Se trata de un estado de equilibrio entre el cultivo celular y el virus, de modo que el virus replica dando lugar a partículas víricas sin causar efecto citopático apreciable, pero se mantiene en el cultivo, ya que las células no lo eliminan del todo. El interés de estos cultivos persistentemente infectados es que, al igual que ocurre *in vivo*, muestran resistencia a la infección por el mismo virus y más raramente por otros virus. Este último fenómeno (resistencia a otro virus) se conoce como interferencia viral y se da entre dos virus de importancia acuícola: IPNV y VHSV.

## ***3. Virus de importancia en piscicultura***

El Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) es un virus perteneciente a la familia *Birnaviridae*, género *Aquabirnavirus*. Se trata de un virus sin envuelta con genoma bisegmentado de RNA bicatenario. El segmento A codifica para las proteínas VP2, VP3 y VP4,

mientras que el segmento B codifica para la proteína VP1. Este virus es capaz de replicar en un amplio rango de especies de peces (M. Martin-Armas *et al.*, 2007), pero es especialmente relevante en salmónidos por su interés en acuicultura ya que causa en ellos una grave enfermedad: necrosis pancreática. Cabe mencionar también que IPNV es capaz de producir infecciones subclínicas (asintomáticas) en un amplio rango de peces de interés comercial de agua salada, como el rodaballo, y de agua dulce, como la carpa y la dorada (P. W. Reno, 1999). En cultivo celular *in vitro* produce infección lítica con efecto citopático en diversas líneas celulares de trucha, carpa y salmón (K. Julin *et al.*, 2014) y además puede establecer infecciones persistentes en distintos tipos celulares, como en EPC (Epitelioma Papuloso de Carpa, procedentes de *Pimephales promela*) y SAF (*Sparus Aurata* Fibroblast, originarios de la dorada), estudiados en este trabajo.

El Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral (VHSV) pertenece a la familia *Rhabdoviridae*, género *Novirhabdovirus*. Se trata de un virus con envuelta y con genoma de RNA negativo monocatenario. Dicho genoma codifica las proteínas N, P, M, G, NV y L. Este virus es capaz de infectar por lo menos a 50 especies de peces de agua dulce y marina, causando una enfermedad sistémica grave, la septicemia hemorrágica. *In vitro*, este virus infecta a cultivos de EPC y SAF, causando infección lítica con efecto citopático y una elevada muerte celular.

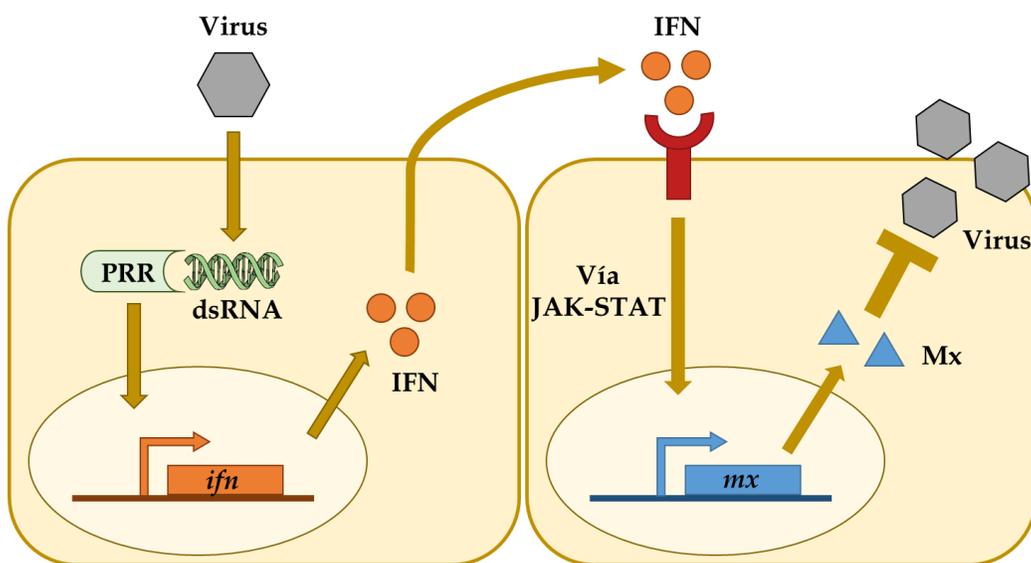
El interés en estos dos virus es que se ha demostrado *in vitro* que cultivos celulares de EPC y SAF persistentemente infectados con IPNV son resistentes a la infección con VHSV (I. García *et al.*, 2011). En el caso particular de la familia de la carpa, se ha encontrado que también *in vivo*, IPNV es capaz de producir infecciones asintomáticas, por lo que es de especial interés estudiar en profundidad la interacción que existe entre estos dos virus y el fenómeno de resistencia que IPNV induce frente a VHSV.

#### ***4. Resistencia a infecciones víricas: la respuesta inmune innata***

A nivel molecular y celular existen dos vías por las que un organismo puede presentar resistencia a una infección viral: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa. De entre estas dos, la innata es la primera línea de defensa contra las infecciones y, en especial los peces, poseen un sistema inmune innato muy desarrollado. Los macrófagos y neutrófilos

son las células del sistema inmune innato responsables del reconocimiento inicial del patógeno. Estas células poseen receptores PRR (del inglés Pattern Recognition Receptors) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos o PAMP (del inglés Pathogen Associate Molecular Patterns) y provocan una respuesta celular con el objetivo de detener la infección.

Un mecanismo clave en la respuesta inmune innata frente a infecciones víricas es el sistema de Interferón tipo I. Tras el reconocimiento de un PAMP vírico (como RNA bicatenario o productos intermedarios de la replicación viral) por parte de un receptor PRR se inicia una cascada de señalización que induce, en primera instancia, la transcripción de Interferón (IFN). Esta molécula es una citoquina que se secreta al medio y que, a través de la vía de señalización JAK-STAT, desencadena en la misma célula y en células vecinas la transcripción de muchos más genes para la protección frente a la infección vírica (véase **Figura 2**). Uno de los genes más relacionados con actividad antiviral es *mx*, que codifica para una proteína con el mismo nombre cuyos efectos antivirales están demostrados, aunque no se conoce con exactitud su mecanismo de acción (M. A. Fernández-Trujillo *et al.*, 2013; Y. M. Chen *et al.*, 2008). Algunos autores apuntan a que la proteína Mx interfiere en la replicación del virus ya que se une directamente a las partículas víricas, lo podría marcarlas para ser eliminadas por algún otro sistema (O. Haller *et al.*, 2007; Y. M. Chen *et al.*, 2008).



**Figura 2.** Esquema simplificado del sistema de Interferón tipo I.

## ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

---

En investigaciones previas llevadas a cabo en este grupo de investigación, se logró generar una infección persistente con el virus IPNV en la línea celular EPC, de carpa. Según el artículo publicado por I. García *et al.* en 2011, se eligió esta línea celular por dos motivos: al presentar baja susceptibilidad a ser infectada con IPNV es un modelo muy bueno para producir una infección persistente y, por otro lado, al ser susceptible a la infección con rhabdovirus permite investigar la interferencia de IPNV con de distintos virus de dicha familia. A las células EPC persistentemente infectadas con IPNV se las nombró como EPC<sup>IPNV</sup>. En artículos posteriores (M. T. Jurado *et al.*, 2013) se caracterizó dicha línea celular, descubriendo que es resistente a la infección con un rhabdovirus de importancia acuícola, VHSV. Además en este artículo también se descubrió que el medio en el que crece un cultivo de EPC<sup>IPNV</sup> (llamado medio condicionado) es capaz de inducir resistencia frente a la infección con VHSV en cultivos de EPC, que normalmente sufren una gran mortalidad. En vista de estos resultados, se especuló que el cultivo persistentemente infectado podría estar liberando al medio ciertos factores antivirales solubles, responsables de la inducción de resistencia.

El planteamiento inicial para este trabajo fue el de generar otra línea celular persistentemente infectada con IPNV para comprobar si las características observadas en el cultivo EPC<sup>IPNV</sup> se mantienen en otros tipos celulares. Así, se eligió la línea celular SAF por dos motivos: por ser de un grupo de peces distinto (orden Perciformes) a la de EPC (Cipriniformes) y por ser de un pez de importancia acuícola, la dorada. Por otro lado, también se propuso profundizar en la resistencia inducida por el medio condicionado de EPC<sup>IPNV</sup>. Más en concreto, los objetivos específicos marcados para este trabajo fueron:

1. Establecer un estado de infección persistente en la línea celular SAF (SAF<sup>IPNV</sup>).
2. Caracterizar las propiedades antivirales de la línea celular SAF<sup>IPNV</sup>.
3. Profundizar en la resistencia contra VHSV inducida por el medio condicionado de EPC<sup>IPNV</sup> y analizar si el medio de condicionado de SAF<sup>IPNV</sup> también es capaz de inducir dicha resistencia.
4. Determinar la presencia de factores antivirales producidos por SAF<sup>IPNV</sup> y su capacidad de inducir la expresión de genes de respuesta inmune.

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

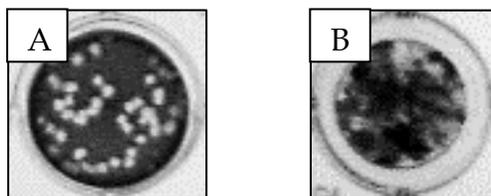
## 1. Cultivos celulares

### 1.1 Medios de cultivo

Para el crecimiento y mantenimiento de las líneas celulares de EPC (EPC, EPC<sup>IPNV</sup>, EPC<sup>IPNV-LW</sup> y EPC<sup>IPNV</sup> de alta temperatura) se usó el medio RPMI-1640 Dutch con 20 mM HEPES (Sigma-Aldrich) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich), 1mM de piruvato (Gibco, Invitrogen), 2mM de glutamina (Gibco, Invitrogen) y antibióticos (50 µg/mL de gentamicina (Sigma) y 2 µg/mL de Anfotericina B (Gibco, Invitrogen)). Este medio se abrevia como RPMI 10%. Para las infecciones víricas de la línea EPC se usó el mismo medio pero suplementado con un 2% de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich). En el presente trabajo, este medio se abrevia como RPMI 2%.

Para el crecimiento y mantenimiento de las líneas celulares de SAF (SAF, SAF<sup>IPNV</sup> y SAF<sup>IPNV</sup> de alta temperatura) se usó el medio Leibovitz L-15 (Biowest) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich), 1mM de piruvato (Gibco, Invitrogen), 2mM de glutamina (Gibco, Invitrogen) y antibióticos (50 µg/mL de gentamicina (Sigma) y 2 µg/mL de Anfotericina B (Gibco, Invitrogen)). En el presente trabajo, este medio se abrevia como L-15 10%. Para las infecciones de los cultivos SAF se usa el mismo medio pero suplementado con 2% de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich), abreviado como L-15 2%.

Para poder observar las calvas que la infección vírica produce sobre la monocapa celular se usó metil celulosa (8 mg/mL en medio RPMI 10% a pH 7). La metil celulosa es un líquido de alta densidad que impide que el virus se distribuya por todo el cultivo, limitando su infección a las células adyacentes (**Figura 3**).



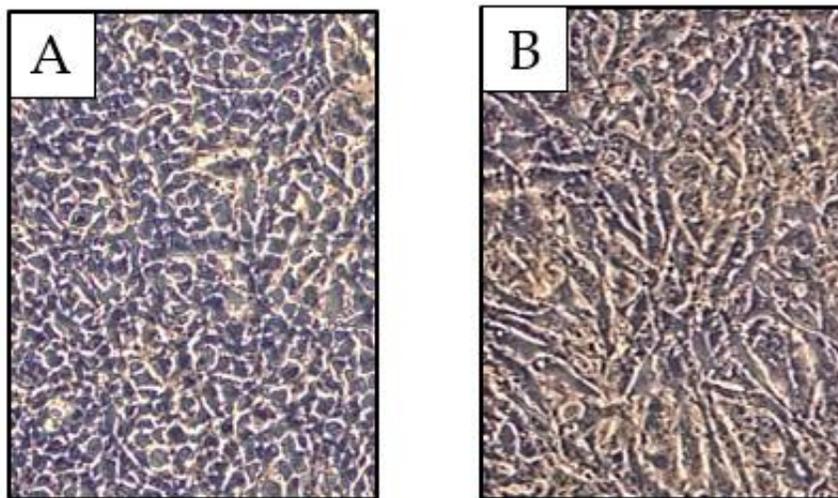
**Figura 3.** Células SAF infectadas con VHSV en metil celulosa (A) y en medio líquido (B).

## 1.2 Líneas celulares

Las células EPC (Epitelioma Papuloso Cyprini) proceden de la carpa *Pimephales promelas*, un pez de la familia de los ciprínidos. Esta línea celular fue comprada a la Colección europea de cultivos celulares (identificación ECACC nº 93120820). Las células EPC se mantuvieron en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (~ 7,5 millones de células) en medio RPMI 10%, a una temperatura de 25°C y en una atmosfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Véase **Figura 4, A**.

Las células SAF (*Sparus Aurata* Fibroblast) son originarias de la dorada, *Sparus aurata*. Esta línea celular fue amablemente cedida por el Dr. Mulero (Universidad de Murcia). Los cultivos de SAF se mantuvieron en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (~2,5 millones de células) en medio L-15 10%, a una temperatura de 25°C y en una atmosfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Véase **Figura 4, B**.

Para subcultivar ambas líneas celulares, las células se despegaron de los frascos con una solución de 0.05 % de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich) y se diluyeron con el medio de cultivo correspondiente (RPMI para EPC y L-15 para SAF) al volumen necesario para sembrar los nuevos frascos o placas.



**Figura 4.** Fotografías al microscopio de campo claro. (A) Células EPC teñidas con Giemsa. (B) Células SAF teñidas con Giemsa.

## 2. Virus e infecciones

### 2.1 Virus usados

El Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) es un virus perteneciente a la familia *Birnaviridae*, género *Aquabirnavirus*. Se trata de un virus sin envuelta con genoma bisegmentado de RNA bicatenario. El segmento A codifica para las proteínas VP2, VP3 y VP4, mientras que el segmento B codifica para la proteína VP1. En este trabajo se han usado dos cepas distintas del IPNV: la cepa Sp aislada en Europa y la cepa LWVRT60 procedente de América, abreviada como LW.

En este trabajo se ha usado también el Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral (VHSV), originario de Francia. Este virus pertenece a la familia *Rhabdoviridae*, género *Novirhabdovirus*. Se trata de un virus con envuelta y con genoma de RNA negativo monocatenario. Dicho genoma codifica las proteínas N, P, M, G, NV y L. La cepa usada en este trabajo es la 07.71.

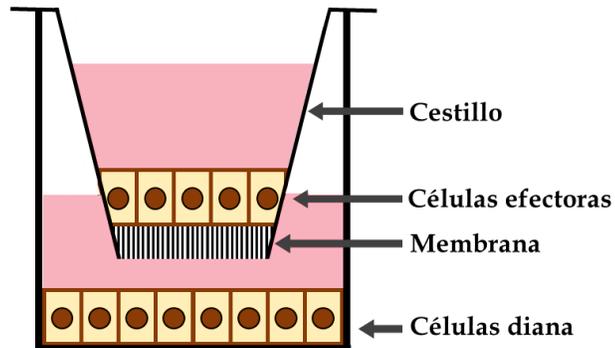
### 2.2 Técnicas de infección

Para infectar una placa se diluye el virus en el volumen necesario de medio (RPMI 2% para EPC y L-15 2% para SAF). A continuación, usando una bomba de vacío, se retira el medio en el que se han crecido las células y se añade el virus disuelto (100  $\mu$ L/pocillo en placa de 96 y 0,5 mL/pocillo en placa de 24). Dependiendo del diseño del experimento existen dos opciones: se deja el virus en la placa hasta finalizar el experimento o se deja infectar durante 90 minutos y se retira con bomba de vacío, añadiendo después medio fresco a la placa. En el caso particular de los experimentos donde se quieren observar calvas, el virus siempre se retira y se añade metil celulosa (0,5 mL/pocillo).

## 3. Sistema de co-cultivo: Transwell<sup>®</sup>

La tecnología Transwell<sup>®</sup> (Thermo Scientific) es un sistema de co-cultivo que permite cultivar a la vez dos tipos celulares en el mismo pocillo. Este sistema está formado por un cestillo suspendido sobre un pocillo de 1,9 cm<sup>2</sup> (pocillo de placa de 24). En el fondo del cestillo existe una membrana permeable de 0,47 cm<sup>2</sup> con poros de 0,4  $\mu$ m. En este trabajo, se ha usado

el sistema sembrando un tipo celular en el fondo del pocillo (células diana) y otro tipo celular en la membrana del cestillo (células efectoras), de modo que los medios líquidos de ambas células estuvieran en contacto (**Figura 5**).



**Figura 5.** Esquema del sistema de co-cultivo Transwell®

## 4. Tinciones

### 4.1 Tinción con cristal violeta

El cristal violeta usado para las tinciones de este trabajo (Basic Violet 3, Sigma) se preparó al 1% peso/volumen, usando como disolvente una disolución 1:9 de formaldehído (Sigma) en agua mili-Q (Milli-Q® A10 Water Purification System, Merck Millipore). Para teñir una placa, se añaden 100  $\mu$ L por pocillo en placa de 96 pocillos o 0,5 mL por pocillo en placa de 24 pocillos y se incuba a temperatura ambiente durante al menos 1h. A continuación, se lava la placa con H<sub>2</sub>O destilada y se deja secar.

### 4.2 Tinción con Giemsa

El Giemsa utilizado para las tinciones de este trabajo se preparó a una concentración de 5 mg/mL (Giemsa Stain G4507-5G, Sigma), usando como disolvente una disolución 1:15 de PBS en agua mili-Q (Milli-Q® A10 Water Purification System, Merck Millipore). Para teñir una placa, las células se fijan previamente incubándolas durante 15 minutos con metanol glacial 100% (100  $\mu$ L por pocillo) a temperatura ambiente. A continuación se añaden 75  $\mu$ L por pocillo de giemsa y se deja incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se retira el giemsa con H<sub>2</sub>O destilada y se deja secar la placa.

## **5. Medidas de densidad óptica y microscopía de campo claro**

### ***5.1 Medidas de densidad óptica***

Para estimar la supervivencia celular en los distintos experimentos, se usó espectrofotometría de absorción. Partiendo de una placa de 96 pocillos teñida con Giemsa, se añaden 100  $\mu$ L por pocillo de metanol 100%. Se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente sobre un agitador de placas (SSM1, Stuart). Transcurrido este tiempo se mide la absorbancia a 620nm con un espectrofotómetro de placas (Anthos labtec).

### ***5.2 Microscopía de campo claro***

Para evaluar el efecto citopático de las infecciones se observaron las placas teñidas mediante microscopía de campo claro (Nikon Eclipse TE2000-U; Nikon instruments, inc., NY, USA). La toma de fotografías se hizo con una cámara digital acoplada al microscopio (Nikon DS-1QM).

## **6. Tratamiento de ácidos nucleicos**

### ***6.1 Diseño de cebadores para PCR cuantitativa***

Los cebadores utilizados en este trabajo fueron sintetizados por la empresa Sigma-Aldrich. Para el diseño de los mismos, se usó la herramienta *Primer Blast* del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Este programa genera varias parejas de cebadores a partir de la secuencia que se quiere amplificar. Se usó también el programa *Primer3 input* (<http://primer3.ut.ee/>) para alinear los cebadores generados con la secuencia diana y elegir el mejor par. Los cebadores elegidos fueron aquellos cuyo producto fuera de 100-250 pb y cuya temperatura de fusión ( $T_m$ ) estuviera entre 62 y 68 °C.

### ***6.2 Extracción de RNA***

La extracción de RNA se realizó utilizando el kit E.N.Z.A. HP Total RNA (Omega Bio-Tek) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Todo el proceso se realiza con material estéril,

autoclavado, a temperatura ambiente, en una sala exclusiva para la manipulación de ácidos nucleicos. En primer lugar, se diluyen 30  $\mu\text{L}$  de tripsinizado celular en 300  $\mu\text{L}$  de TRK buffer lysis con 20  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol por mL de buffer. Las muestras se almacenan a  $-80^\circ\text{C}$  al menos 24h. Pasado este tiempo, las muestras se descongelan y se diluyen en 330  $\mu\text{L}$  de etanol 70%. Esta mezcla se añade a la columna Hi-Bind RNA (columna + tubo colector), incluida en el kit y se centrifuga a 10.000 g durante 1 min (Mikro 12-24, Hettich Zentrifugen). Se descarta el eluido. A continuación, se añaden a la columna 500  $\mu\text{L}$  de RNA Wash Buffer I y se centrifuga a 10.000 g durante 30s. Se descarta nuevamente el eluido. Seguidamente, se añaden a la columna 500  $\mu\text{L}$  de RNA Wash Buffer II y se centrifuga a 10.000 g durante 1 min. Se descarta el eluido y se repite este último paso. A continuación, se centrifuga la columna vacía a 12.000 g durante 2 min para secarla. Se cambia el tubo colector por un eppendorf de 1,5 mL estéril, se añaden 40  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC RNAsa free en el centro de la columna y se centrifuga a 12.000 g durante 2 minutos. El RNA eluido, se mantiene en hielo y se cuantifica en  $\text{ng}/\mu\text{L}$  mediante espectrofotometría (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific). Finalmente el RNA se almacena a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso.

### ***6.3 Síntesis de cDNA (retrotranscripción)***

Para la obtención del cDNA, el RNA extraído se incuba, usando un termociclador (GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems), con 0.5  $\mu\text{L}$  de hexámeros aleatorios (~90 ng) (Roche) y 1  $\mu\text{L}$  de una mezcla 10 mM de deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs, Roche) durante 5 min a  $65^\circ\text{C}$ . Tras la incubación se añaden 4  $\mu\text{L}$  de *5X first standard buffer* (250 mM Tris- HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM  $\text{MgCl}_2$ ) (Invitrogen)), 2  $\mu\text{L}$  de 0.1 M ditioneitol (DTT, Invitrogen), 0.5  $\mu\text{L}$  de inhibidor de 20U/ $\mu\text{L}$  RNAsa (Applied Biosystem) y 0.5  $\mu\text{L}$  de transcriptasa inversa MMLV 100 U (Invitrogen). Esta última mezcla se incuba durante 10 min a  $25^\circ\text{C}$ , seguidamente durante 50 min a  $37^\circ\text{C}$  y posteriormente durante 15 min a  $70^\circ\text{C}$ . El cDNA obtenido se almacena a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso.

### ***6.4 PCR cuantitativa (PCR en tiempo real)***

Para realizar la PCR cuantitativa a tiempo real se usa el sistema ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems, NJ, USA) y SYBR Green (Life Technologies, United Kingdom). Las reacciones se llevan a cabo en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  que contiene 2  $\mu\text{L}$  del cDNA sintetizado

previamente, 300 nM de cada cebador y 10  $\mu$ L de SYBR Green Master Mix. Dicho volumen se alicuota en una placa óptica de 96 pocillos (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems), se cubre la placa con tapas (MicroAmp Optical 8-Cap Strip, Applied Biosystems) y se centrifuga a 2.000 rpm durante 5 min (GS-6 Centrifuge, Beckman). Las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa fueron las siguientes: un ciclo de 2 min a 50°C y 15 min a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 15s a 95°C y 1 min a 60°C. Para cada mRNA, la expresión fue corregida por el valor de la expresión de un gen endógeno de expresión constitutiva (*18S* o *eF1 $\alpha$* ). El análisis de la expresión génica se realizó mediante el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , donde  $\Delta C_t$  se determina sustrayendo el valor  $C_t$  del gen endógeno al valor del  $C_t$  objetivo. Las secuencias de los cebadores utilizados en los ensayos se muestran en la **Tabla 1**.

Gen	Referencia (Genbank)	Secuencia
<b>EPC-<i>eF1<math>\alpha</math></i></b>	AY643400.1	F: CTGGAGGCCAGCTCAAACAT R: CATTTCCTCCTTACGCTCAAC
<b>EPC-<i>mx</i></b>	AY751300.1	F: GGAGAAGAGGTTAAATGTGGATCAG R: TGACCGAATCAAGAAGTCATTCC
<b>EPC-<i>ifn</i></b>	FN178457.1	F: ACAGGCAGTCGTCGGAACCTTA R: TGAAGTGCCTTTTTTATCTTAATCTCGT
<b>SAF-<i>eF1<math>\alpha</math></i></b>	AF184170	F: CTGTCAAGGAAATCCGTCGT R: TGACCTGAGCGTTGAAGTTG
<b>SAF-<i>mx1</i></b>	FJ490556.1	F: GGTTCGTCCCTCATCGA R: GCGCCAAGTCCCTCTCTACA
<b>SAU-<i>ifn</i></b>	AM937107.2	F: AGAAGAACAAGAAGCTGCACATGT R: TCAGCACTGTGGCCCATTC
<b>IPNV-A</b>	AJ622822	F: TCTCCCGGGCAGTTCAAGT R: CGGTTTCACGATGGGTTGTT

**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados como cebadores para el análisis de PCR

# RESULTADOS

---

## 1. Resistencia de EPC<sup>IPNV</sup> y SAF<sup>IPNV</sup> a VHSV

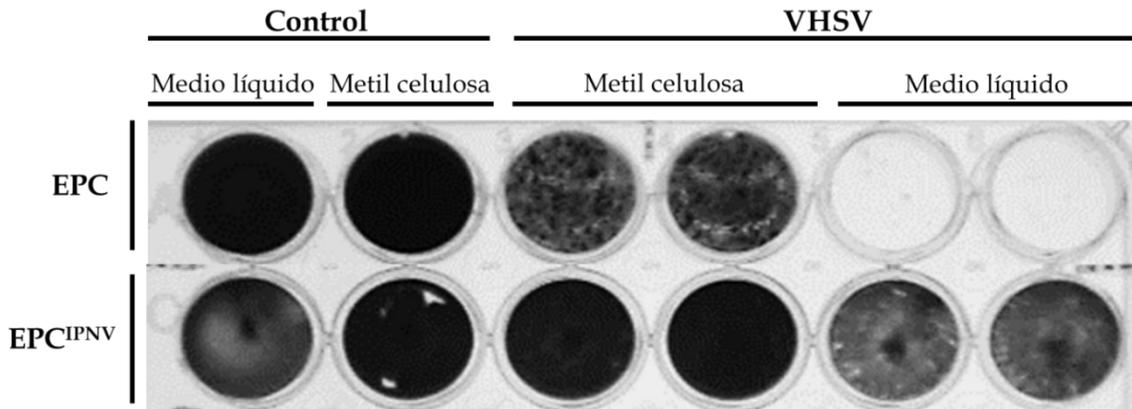
### 1.1 Establecimiento de líneas celulares persistentemente infectadas con IPNV

Se generó una línea celular de EPC persistentemente infectada con IPNV (EPC<sup>IPNV</sup>). Para ello, se partió de un bote de 25 cm<sup>2</sup> sembrado con células EPC confluyente y se infectó con el virus IPNV cepa Sp a una multiplicidad de 0.05 virus/célula usando el medio RPMI 2%. Este bote se incubó durante tres días a 21°C, que no es la temperatura óptima ni para el virus ni para las células (la óptima sería 14°C para el virus y 28°C para las células), con lo que se consigue que el virus permanezca en el cultivo sin causar daños severos. Pasados los tres días, se retiró el virus y se dio un pase a las células usando medio fresco (RPMI-10%). Al cabo de 10 días, se dio otro pase al bote consiguiendo así un cultivo persistentemente infectado.

Del mismo modo, se generó una línea celular SAF<sup>IPNV</sup> partiendo de un bote de 25 cm<sup>2</sup> sembrado con células SAF confluyente. Se infectó el bote con IPNV cepa Sp a una multiplicidad de 0.05 virus/célula usando el medio L-15 2%. Se incubó a 21°C tres días (la temperatura óptima para las células es de 25°C) y se retiró el virus dando un pase a las células con medio fresco (L-15 10%). Al cabo de 10 días, se dio otro pase al bote y el cultivo resultante ya se considera SAF<sup>IPNV</sup>.

### 1.2 Resistencia de EPC<sup>IPNV</sup> a VHSV

En trabajos anteriores realizados en este laboratorio (I. García *et al.*, 2011), se demostró que los cultivos de EPC persistentemente infectados con IPNV son resistentes a la superinfección con VHSV. Para confirmar la correcta generación de las células EPC<sup>IPNV</sup>, se estudió la resistencia del nuevo cultivo a dicho virus. Así pues, se sembró una placa de 24 pocillos con células EPC y EPC<sup>IPNV</sup> y se infectó con VHSV (moi: 500 virus/pocillo) siguiendo el protocolo estándar de infección.



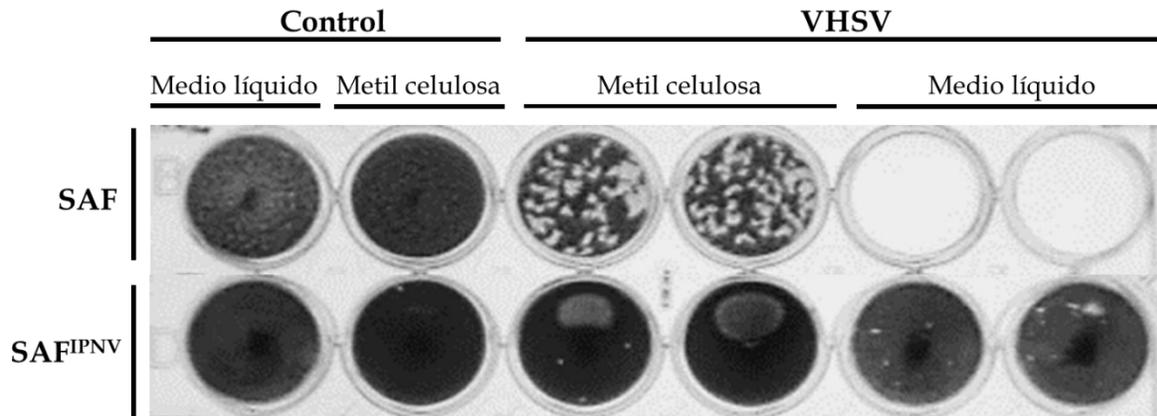
**Figura 6.** Células EPC y EPC<sup>IPNV</sup>, infectadas con VHSV (moi: 500 virus/pocillo), en medio líquido (RPMI 10%) o metil celulosa y teñidas con cristal violeta a los 7 días post infección.

El resultado observado es que especialmente en las infecciones en medio líquido, mientras las células EPC mueren al ser infectadas con VHSV, las EPC<sup>IPNV</sup> son resistentes a la infección (**Figura 6**). Por tanto, se confirma que el cultivo generado es, efectivamente, EPC<sup>IPNV</sup> y se usó como tal para experimentos posteriores.

### 1.3 Resistencia de SAF<sup>IPNV</sup> a VHSV

Se quiso comprobar si se podía establecer una infección persistente con IPNV en otro tipo celular distinto de EPC (cipriniformes): la línea celular SAF, de dorada (Perciformes). Así, se generó la línea SAF<sup>IPNV</sup> siguiendo el protocolo del apartado 1.1 de resultados. Para confirmar que el establecimiento de la infección persistente en SAF se había llevado a cabo correctamente, se analizó la resistencia de este nuevo cultivo a VHSV. Se sembró una placa de 24 con células SAF y SAF<sup>IPNV</sup> y se infectó con VHSV (moi: 500 virus/pocillo) siguiendo el protocolo estándar de infección.

La **Figura 7** demuestra que al contrario que las SAF, el cultivo de SAF<sup>IPNV</sup> es resistente a la superinfección con VHSV tanto en medio líquido como en metil celulosa. Así pues, se confirma el correcto establecimiento de la línea celular SAF<sup>IPNV</sup> y se usó como tal en experimentos posteriores.



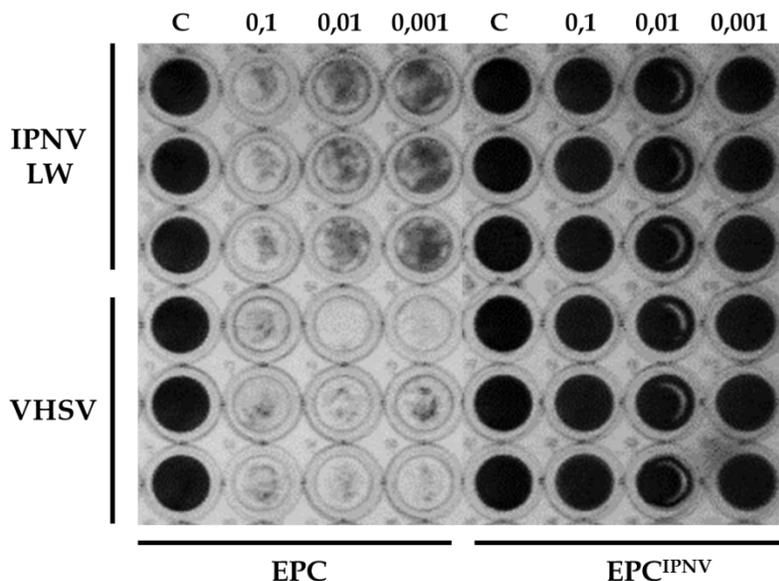
**Figura 7.** Células SAF y SAF<sup>IPNV</sup> infectadas con VHSV (moi: 500 virus/pocillo), en medio líquido o metil celulosa, y teñidas con cristal violeta a los 7 días post infección.

#### 1.4 Resistencia de EPC<sup>IPNV</sup> a IPNV- LWVRT60 y VHSV

Con el objetivo de ahondar en el estudio de la línea celular EPC<sup>IPNV</sup>, se analizó más en profundidad su resistencia a VHSV y a la cepa LWVRT60 (LW para abreviar) de IPNV.

En el experimento anterior realizado con EPC<sup>IPNV</sup> (apartado 1.3), se observó que este cultivo es resistente a VHSV a una multiplicidad de 500 virus/pocillo, que equivale aproximadamente a 1 virus/1000 células. Teniendo esto en cuenta, se diseñó un experimento para estudiar la resistencia de EPC<sup>IPNV</sup> a concentraciones más elevadas de VHSV. Así pues, se sembró una placa de 96 pocillos con células EPC y EPC<sup>IPNV</sup> y se infectó con VHSV a 0.001, 0.01 y 0.1 virus/célula. En los resultados mostrados en la **Figura 8**, se observa que el cultivo EPC<sup>IPNV</sup> es resistente a la infección con VHSV a todas las multiplicidades estudiadas.

Por otro lado, se estudió también la resistencia del cultivo EPC<sup>IPNV</sup> a la cepa LW de IPNV. Como ya se ha explicado anteriormente (apartado 2.1 de Materiales y Métodos), el virus IPNV que se usa para crear la línea celular EPC<sup>IPNV</sup> y SAF<sup>IPNV</sup> es una cepa europea llamada Sp, mientras que el virus que se utiliza en este experimento es la cepa americana LW. El objetivo de este ensayo era determinar si el cultivo de EPC<sup>IPNV</sup> que está persistentemente infectado con la cepa Sp de IPNV, mostraba resistencia a la infección con una cepa distinta, la LW del mismo virus. De este modo, se sembró una placa de 96 pocillos con células EPC y EPC<sup>IPNV</sup> y se infectó con IPNV-LW, a diferentes multiplicidades (0.1, 0.01 y 0.001 virus/célula).



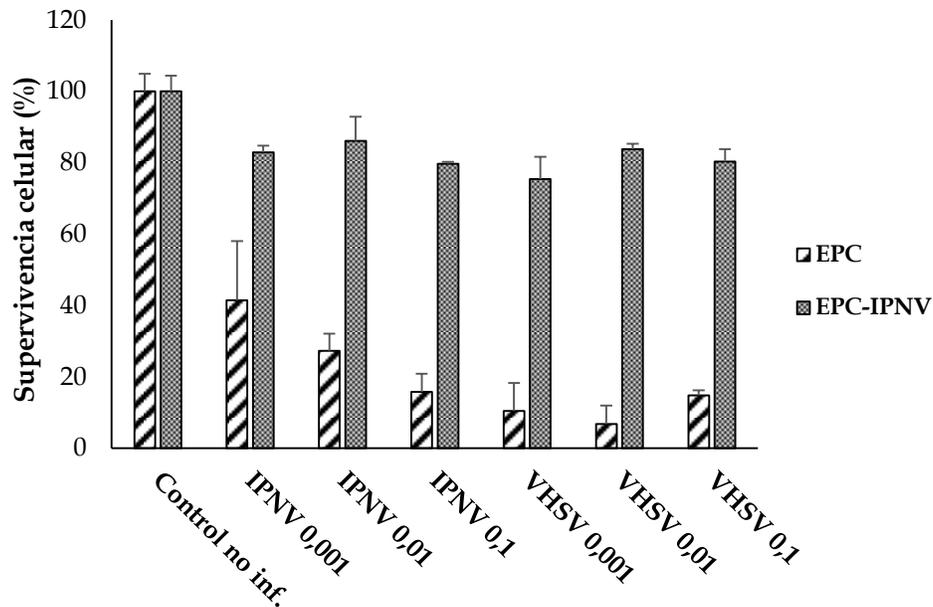
**Figura 8.** Células EPC y EPC<sup>IPNV</sup> infectadas con IPNV- LW y VHSV a distintas multiplicidades (0.1, 0.01 y 0.001). Tras 7 días, las células fueron fijadas con metanol y teñidas con giemsa.

Los resultados obtenidos demuestran que el virus IPNV-LW es capaz de infectar a las células EPC (aunque no con la eficiencia de VHSV), causando más muerte celular a las multiplicidades más altas. Sin embargo, la línea EPC<sup>IPNV</sup> mostró resistencia al virus a todas las multiplicidades estudiadas (**Figura 8**).

Para obtener una medida cuantitativa de los resultados, se determinó la cantidad de células en la placa mediante espectrofotometría de absorción, siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. La media de las absorbancias de los controles sin infectar se tomó como 100% de supervivencia celular y se usó para estimar la supervivencia relativa de las células infectadas.

En la **Figura 9** se observa que las células EPC<sup>IPNV</sup> son resistentes a la infección con VHSV y con IPNV-LW, incluso a la multiplicidad más alta (0.1 virus/célula). Además, dicho cultivo muestra una resistencia similar (~80% supervivencia) a la infección por ambos virus. Por otro lado, a 7 días post infección la mortalidad celular en EPC es igual a las tres multiplicidades de VHSV (20% de supervivencia). En cambio, para el caso de IPNV-LW, en el cultivo de EPC se observa una clara correlación entre la cantidad de virus y la muerte celular: más muerte

celular a la multiplicidad más alta (20% de supervivencia) y menos muerte con la multiplicidad más baja (50% de supervivencia).



**Figura 9.** Resistencia de las células EPC y EPC<sup>IPNV</sup> a la infección con VHSV e IPNV-LW a tres multiplicidades. Se midió la absorbancia a 620nm de la placa fijada y teñida. La media de las absorbancias de los controles sin infectar se tomó como 100% de supervivencia y se usó para calcular la supervivencia relativa en los pocillos infectados.

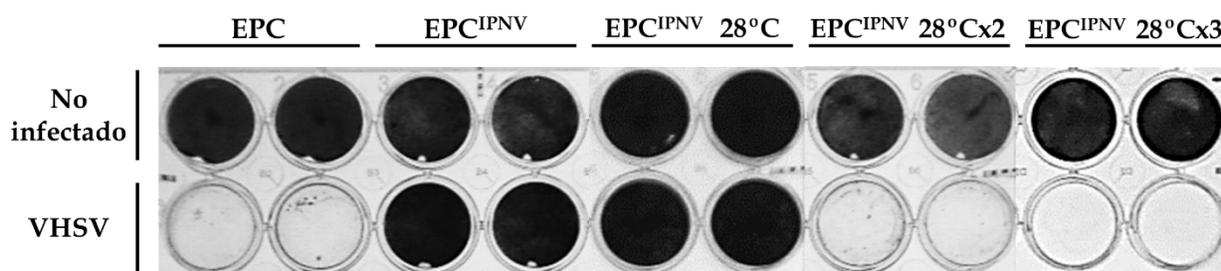
## 2. Dependencia de la interferencia viral de IPNV

### 2.1 Experimentos de subida de temperatura (*shift-up*)

En los apartados anteriores se ha demostrado que las células EPC<sup>IPNV</sup> y SAF<sup>IPNV</sup> son resistentes a VHSV. Sin embargo, para confirmar que dicha resistencia se debe a la infección persistente establecida por IPNV, se llevaron a cabo distintos experimentos en los que la temperatura de crecimiento celular fue de 28°C para las células EPC<sup>IPNV</sup> y 25°C para las SAF<sup>IPNV</sup>. La explicación de esta subida de temperatura es que IPNV es incapaz de replicar por encima de 21°C. Por tanto, el aumento de temperatura permite inhibir su replicación y así, poder confirmar que se requiere una infección persistente de IPNV para que el cultivo adquiera resistencia a VHSV.

## 2.2. Efecto de la subida de temperatura sobre la resistencia de EPC<sup>IPNV</sup> a VHSV

Con el objetivo de demostrar que la infección persistente con IPNV en EPC<sup>IPNV</sup> es la responsable de su resistencia a VHSV, se repitió el experimento del apartado 1.2 usando cultivos de EPC<sup>IPNV</sup> crecidos a 28°C. Así pues, se sembraron placas de 24 pocillos con células EPC, EPC<sup>IPNV</sup> y EPC<sup>IPNV</sup> tras uno (EPC<sup>IPNV</sup> 28°C), dos (EPC<sup>IPNV</sup> 28°Cx2) y tres (EPC<sup>IPNV</sup> 28°Cx3) pases a 28°C. Al día siguiente de la siembra, se infectaron las placas con VHSV (moi: 200 virus/pocillo).



**Figura 10.** Células EPC, EPC<sup>IPNV</sup> y EPC<sup>IPNV</sup> tras uno (EPC<sup>IPNV</sup> 28°C), dos (EPC<sup>IPNV</sup> 28°Cx2) y tres (EPC<sup>IPNV</sup> 28°Cx3) pases a 28°C, infectadas con VHSV (moi: 200 virus/pocillo). Tras 7 días las placas se tiñeron y fijaron con cristal violeta.

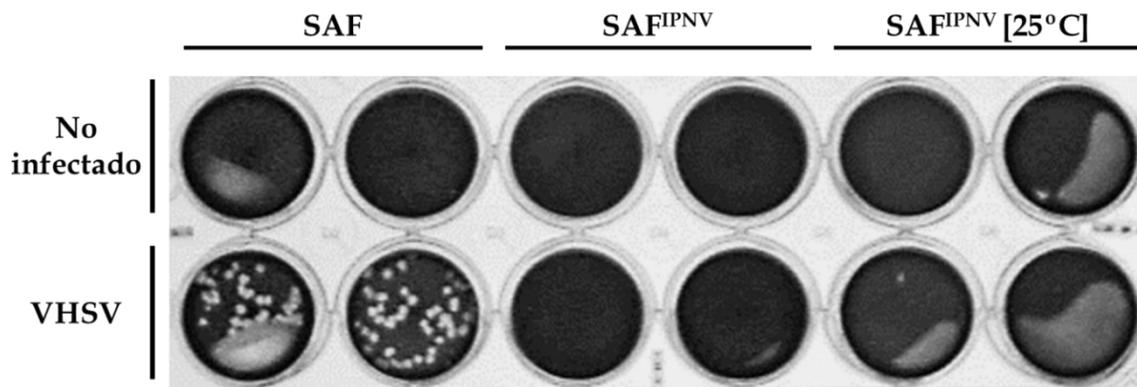
La **Figura 10** muestra que a partir del segundo pase a alta temperatura (EPC<sup>IPNV</sup> 28°Cx2), las células EPC<sup>IPNV</sup>, que en un principio eran resistentes, se vuelven sensibles a la infección con VHSV.

## 2.3 Efecto de la subida de temperatura sobre la resistencia de SAF<sup>IPNV</sup> a VHSV

Se estudió si, al igual que ocurre con las células EPC<sup>IPNV</sup>, en las SAF<sup>IPNV</sup> el aumento de la temperatura inhibe la replicación de IPNV y sensibiliza al cultivo a la infección con VHSV. El objetivo inicial era realizar un experimento similar al anterior con EPC<sup>IPNV</sup>, es decir, sembrar placas de 24 pocillos con SAF<sup>IPNV</sup> con uno (SAF<sup>IPNV</sup> 25°C), dos (SAF<sup>IPNV</sup> 25°Cx2) y tres (SAF<sup>IPNV</sup> 25°Cx3) pases a alta temperatura. Sin embargo, no se consiguió sembrar SAF<sup>IPNV</sup> con más de un pase a alta temperatura puesto que la gran mortalidad impedía obtener una monocapa celular. Esto podría deberse a que las células SAF<sup>IPNV</sup> son menos estables que las EPC<sup>IPNV</sup>, ya que en el laboratorio, la línea celular EPC<sup>IPNV</sup> puede mantenerse durante más de 40 pases, mientras que la SAF<sup>IPNV</sup> tiene un máximo de 10. Además de esto, también es posible que la

exposición a alta temperatura sumada a la persistencia de la infección con IPNV, genere en esta línea un estrés responsable de la muerte celular.

Por este motivo, se sembró una placa de 24 pocillos con células SAF, SAF<sup>IPNV</sup> y SAF<sup>IPNV</sup> con solo un pase a 25°C y se infectó con VHSV (moi: 200 virus/pocillo). Los resultados obtenidos (**Figura 11**) son similares a los descritos en EPC<sup>IPNV</sup>: tras un solo pase a alta temperatura, las células SAF<sup>IPNV</sup> siguen siendo resistentes a VHSV.

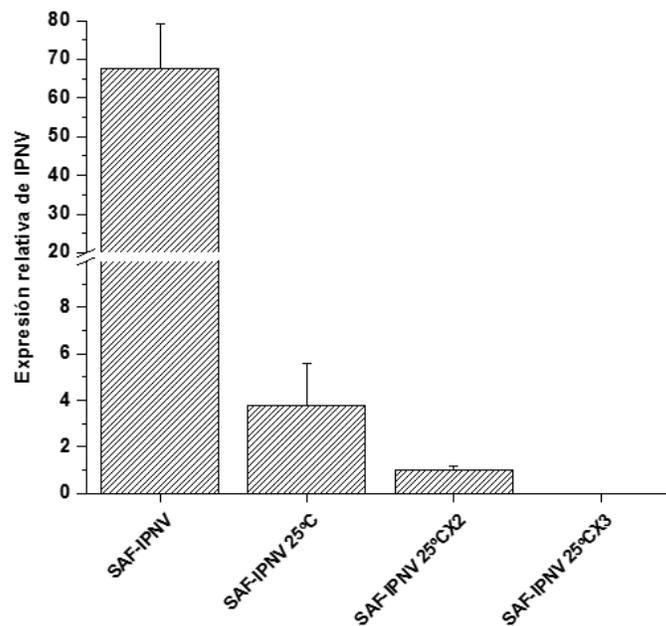


**Figura 11.** Células SAF, SAF<sup>IPNV</sup> y SAF<sup>IPNV</sup> tras un pase a 25°C, infectadas con VHSV en metil celulosa (moi: 200 virus/pocillo), teñidas y fijadas con cristal violeta a los 7 días post infección.

#### **2.4 Estudio de la expresión de IPNV en SAF<sup>IPNV</sup> con dos y tres pases a 25°C**

Como ya se ha mencionado, debido a la gran mortalidad, no se puede sembrar una placa con células SAF<sup>IPNV</sup> con dos y tres pases a 25°C sobre la que llevar a cabo un experimento de formación de calvas. Sin embargo, las pocas células supervivientes a alta temperatura son suficientes para estudiar, mediante qPCR la replicación de IPNV. De este modo, se llevo a cabo una qPCR para determinar si, al igual que ocurre en la línea celular EPC<sup>IPNV</sup>, a partir del segundo pase a alta temperatura la replicación del virus se inhibe.

Como se observa en el gráfico (**Figura 12**), en las células SAF<sup>IPNV</sup> la cantidad de IPNV es un orden de magnitud superior a los cultivos expuestos a 25°C, confirmando que esta temperatura inhibe la replicación del virus. Por otro lado, y como se esperaba, cuanto más pases permanecen las células a 25°C, menos replicación de IPNV presentan, llegando a ser indetectable al tercer pase a alta temperatura (SAF-IPNV 25°C x 3).



**Figura 12.** Expresión relativa de IPNV en las células SAF<sup>IPNV</sup>, SAF<sup>IPNV</sup> tras uno (SAF-IPNV 25°C), dos (SAF-IPNV 25°Cx2) y tres pases (SAF-IPNV 25°Cx3) a 25°C. Los niveles de expresión se determinaron mediante RT-qPCR de IPNV (segmento A) y se expresaron respecto a un gen endógeno constitutivo, el 18S.

Según estos resultados y los de apartado anterior, las células SAF<sup>IPNV</sup> con un solo pase a alta temperatura (SAF-IPNV 25°C), a pesar de tener alrededor de 15 veces menos replicación de IPNV que las SAF<sup>IPNV</sup>, siguen siendo resistentes a la infección por VHSV (veáse **Figura 11**). Por otro lado, el cultivo de SAF<sup>IPNV</sup> con tres pases a alta temperatura (SAF-IPNV 25°C x 3), presenta un nivel indetectable de IPNV, por lo que cabría esperar que se comporte como un cultivo de SAF e igual que el cultivo de EPC<sup>IPNV</sup> 28°Cx3, es decir, sensible de nuevo a la infección con VHSV.

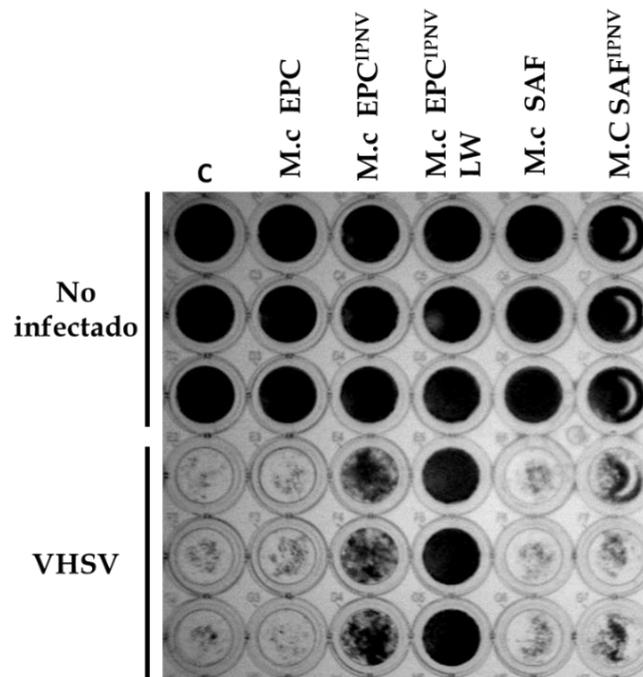
### 3. Actividad antiviral de medios condicionados procedentes de líneas persistentemente infectadas

#### 3.1. Actividad de medios condicionados de EPC<sup>IPNV</sup> y SAF<sup>IPNV</sup> sobre EPC

En trabajos realizados anteriormente (I. García *et al*, 2010), se había visto que el sobrenadante de un cultivo de EPC<sup>IPNV</sup> (también llamado medio condicionado) induce una

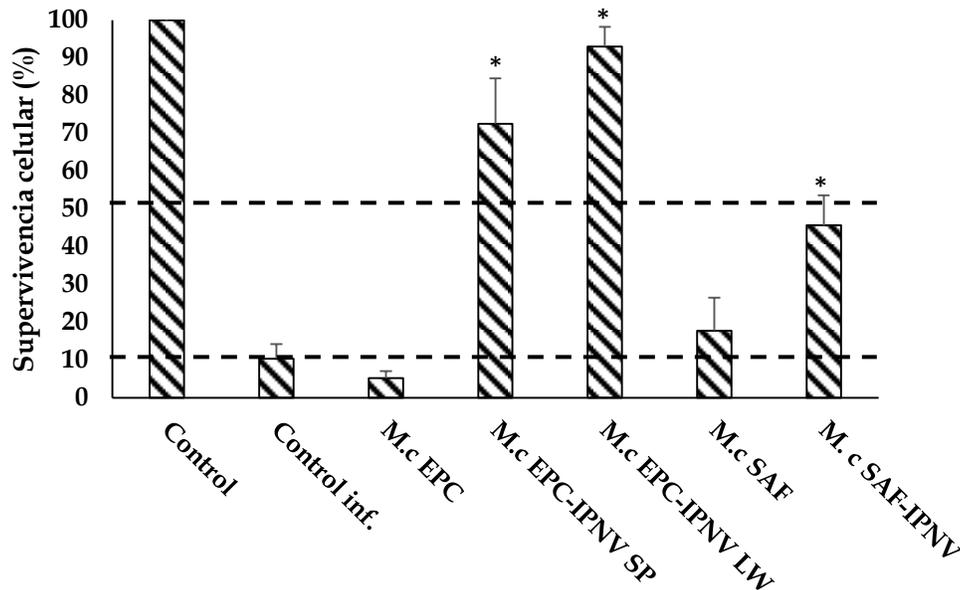
resistencia parcial contra VHSV a un cultivo de EPC, normalmente sensible a este virus. Así pues, se realizó un experimento para estudiar si los sobrenadantes de EPC<sup>IPNV-LW</sup> y de SAF<sup>IPNV</sup> ofrecían también esa misma resistencia al virus (homóloga y heteróloga, respectivamente).

Para ello, se sembró una placa de 96 pocillos con células EPC. Las células se incubaron con sobrenadantes de cultivos de EPC, EPC<sup>IPNV</sup>, EPC<sup>IPNV-LW</sup>, SAF y SAF<sup>IPNV</sup>, diluidos 1:4. Pasadas 24 horas, se retiraron los medios condicionados y se infectó la placa con VHSV (moi: 0,01 virus/célula). Los resultados (**Figura 13**) muestran que las células EPC incubadas con medio condicionado de EPC<sup>IPNV-LW</sup> y EPC<sup>IPNV</sup> son resistentes a VHSV. Además, el medio condicionado de SAF<sup>IPNV</sup> genera una resistencia parcial frente a la infección de VHSV. En cambio, los sobrenadantes de cultivos sin infección persistente (sobrenadantes de SAF y EPC), no protegen a las células del virus, exhibiendo una muerte celular similar a la del control infectado.



**Figura 13.** Células EPC incubadas durante 24 horas con medio RPMI 10% (C) o con sobrenadantes de distintos cultivos (EPC, EPC<sup>IPNV</sup>, EPC<sup>IPNV-LW</sup>, SAF y SAF<sup>IPNV</sup>), posteriormente infectadas con VHSV (moi: 0,01). A los 6 días post infección, las células fueron fijadas con metanol y teñidas con Giemsa.

Para poder cuantificar y comparar los efectos protectores de cada medio condicionado, se determinó la cantidad de células supervivientes en la placa mediante espectrofotometría de absorción.



**Figura 14.** Resistencia de células EPC a VHSV (moi: 0,01), incubadas previamente a la infección con medios condicionados de EPC, EPC<sup>IPNV</sup>, EPC<sup>IPNV-LVWV60</sup>, SAF y SAF<sup>IPNV</sup>. Se midió la absorbancia de la placa teñida a 620 nm. El triplicado de las absorbancias de los controles sin infectar se tomó como 100% de supervivencia y se usó para calcular la supervivencia relativa en los pocillos infectados. (\*) Análisis ANOVA,  $\alpha=0.1$ .

Como se puede observar en el gráfico (**Figura 14**), los medios condicionados de EPC y de SAF, no protegen a las células de la infección (el análisis ANOVA realizado respecto al control infectado, p-valor > 0,1). En el caso particular del sobrenadante de EPC, llega incluso a haber más muerte celular que en el control infectado (~5% de supervivencia celular frente a ~10% en el control infectado). Por otro lado, se observa que los medios condicionados de EPC<sup>IPNV</sup> y EPC<sup>IPNV-LW</sup> confieren resistencia a VHSV (~75% y ~95% de supervivencia celular, respectivamente), mientras que el procedente de la línea heteróloga, SAF<sup>IPNV</sup> tiene menos efecto (~50% de supervivencia) aunque también es significativo (análisis ANOVA realizado respecto al control infectado, p-valor < 0,1).

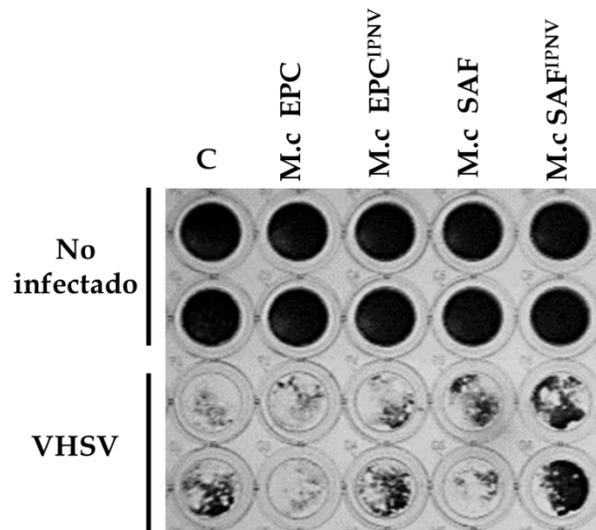
A grandes rasgos, se puede concluir que los medios condicionados de los cultivos persistentemente infectados con IPNV (EPC<sup>IPNV</sup>, EPC<sup>IPNV-LW</sup>, y SAF<sup>IPNV</sup>) ofrecen cierta

protección contra la superinfección con VHSV, siendo esta mayor en el caso de los medios procedentes de EPC<sup>IPNV</sup>, independientemente de la cepa.

### 3.2. Actividad de medios condicionados de EPC<sup>IPNV</sup> y SAF<sup>IPNV</sup> sobre SAF

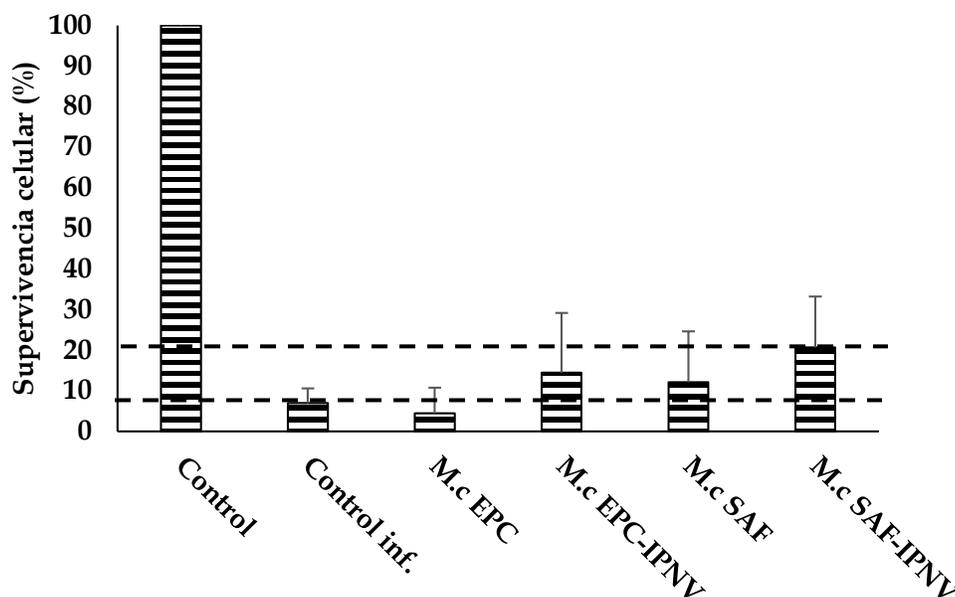
En el experimento anterior, se ha demostrado que los medios condicionados de EPC<sup>IPNV</sup> y SAF<sup>IPNV</sup> ofrecen a las células EPC resistencia a VHSV. A continuación se quiso comprobar si ésta resistencia era recíproca, es decir, si los medios condicionados de EPC<sup>IPNV</sup> y SAF<sup>IPNV</sup> también ofrecen resistencia a un cultivo de SAF. Así pues, se sembró una placa de 96 pocillos con células SAF y se incubó durante 24h con sobrenadantes de cultivos de EPC, EPC<sup>IPNV</sup>, SAF y SAF<sup>IPNV</sup>, diluidos 1:4. Pasado ese periodo, se retiraron los medios condicionados y se infectó la placa con VHSV.

Como se puede observar en la **Figura 15**, solo el medio condicionado de SAF<sup>IPNV</sup> ofrece una ligera protección a las células SAF frente a la infección con VHSV.



**Figura 15.** Células SAF incubadas durante 24 horas con medio L-15 10% (C) o con sobrenadantes de distintos cultivos (EPC, EPC<sup>IPNV</sup>, SAF y SAF<sup>IPNV</sup>), posteriormente infectadas con VHSV (moi: 0,01). Tras 10 días post infección, las células fueron fijadas con metanol y teñidas con Giemsa.

Para poder cuantificar la actividad antiviral de los distintos medios condicionados, se estimó la supervivencia celular mediante espectrofotometría de absorción.



**Figura 16.** Resistencia de células SAF a VHSV (moi: 0,01), incubadas previamente a la infección con medios condicionados de EPC, EPC<sup>IPNV</sup>, SAF y SAF<sup>IPNV</sup>. Se midió la absorbancia a 620 nm. La media de las absorbancias de los controles sin infectar se tomó como 100% de supervivencia y se usó para calcular la supervivencia relativa en los pocillos infectados.

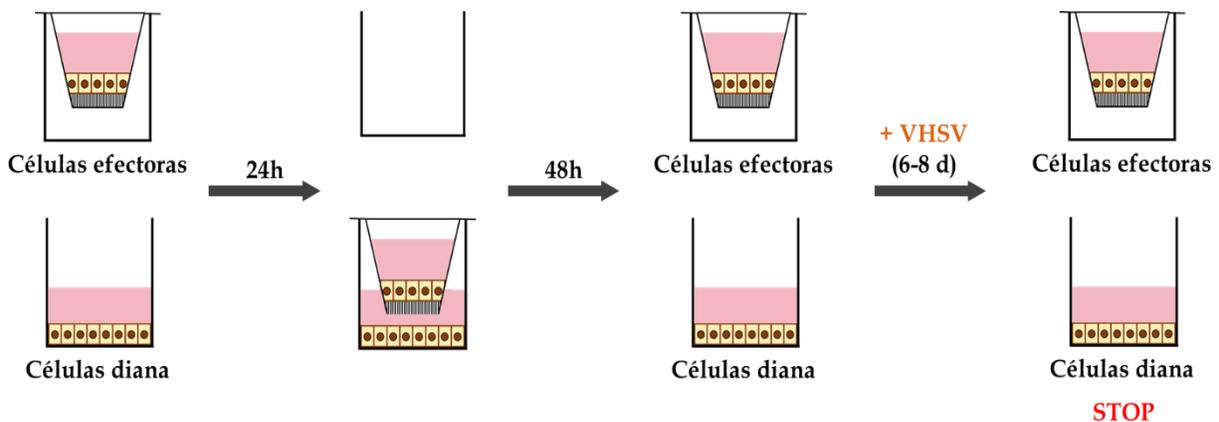
Los resultados (**Figura 16**) muestran que los medios condicionados de EPC<sup>IPNV</sup> y SAF<sup>IPNV</sup> protegen más contra VHSV que los demás medios. A pesar de esto, no se puede considerar que exista realmente un efecto protector con los medios condicionados en las células SAF puesto que no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la supervivencia celular en el control infectado y en las células tratadas (análisis ANOVA, p-valor>0,1).

Se realizaron otros ensayos (no mostrados) sobre células SAF con medios condicionados de SAF<sup>IPNV</sup> y EPC<sup>IPNV-LW</sup>, en los que sí se observó protección contra VHSV (supervivencia cercana al 100%). Sin embargo, en el control infectado se midió una supervivencia del 70% por lo que tampoco se pudo concluir con seguridad que dichos sobrenadantes tuvieran efecto protector.

#### 4. Estudio de la interferencia viral en el sistema de co-cultivo Transwell®

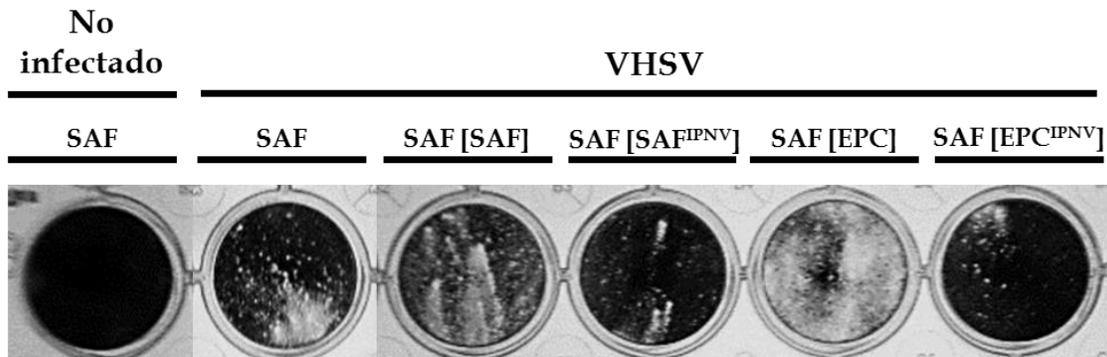
Dado que los experimentos con medios condicionados de EPC<sup>IPNV</sup> y SAF<sup>IPNV</sup> demostraron inducir resistencia contra la infección de VHSV a cultivos silvestres, se planteó la posibilidad de que los cultivos persistentemente infectados con IPNV liberaran al medio algún tipo de factor antiviral, inductor de dicha resistencia. Para estudiar esta posible interacción entre cultivos silvestres y persistentemente infectados, se utilizó el sistema Transwell® (Thermo Fisher Scientific) que, como ya se ha explicado previamente, permite cultivar a la vez dos tipos celulares en el mismo pocillo, de forma que ambos cultivos comparten el medio.

Más concretamente, en este experimento se quiso analizar si las células SAF co-cultivadas con SAF<sup>IPNV</sup> y EPC<sup>IPNV</sup> adquirirían resistencia a la infección con VHSV. Así pues, se sembraron los pocillos con SAF (células diana) y los cestillos con SAF, SAF<sup>IPNV</sup>, EPC y EPC<sup>IPNV</sup> (células efectoras). Al cabo de 24h se movieron los cestillos a los pocillos sembrados con SAF y se dejaron en contacto ambos cultivos durante 48h. Pasado este tiempo, los cestillos se retiraron y se infectaron los pocillos de SAF con VHSV (moi: 2.000 virus/pocillo). Véase **Figura 17**.



**Figura 17.** Esquema del protocolo de infección en sistema Transwell®.

El resultado obtenido (**Figura 18**) muestra que, tal como se esperaba, los pocillos de SAF co-cultivados con SAF<sup>IPNV</sup> y EPC<sup>IPNV</sup> (SAF[SAF<sup>IPNV</sup>] y SAF[EPC<sup>IPNV</sup>]) son más resistentes a la infección con VHSV que los pocillos en co-cultivo con las mismas líneas sin infección persistente (SAF[SAF] y SAF[EPC]). Esto parece indicar que, efectivamente, los cultivos persistentemente infectados con IPNV liberan algún tipo de factor soluble que induce al cultivo de SAF un estado de resistencia frente VHSV.



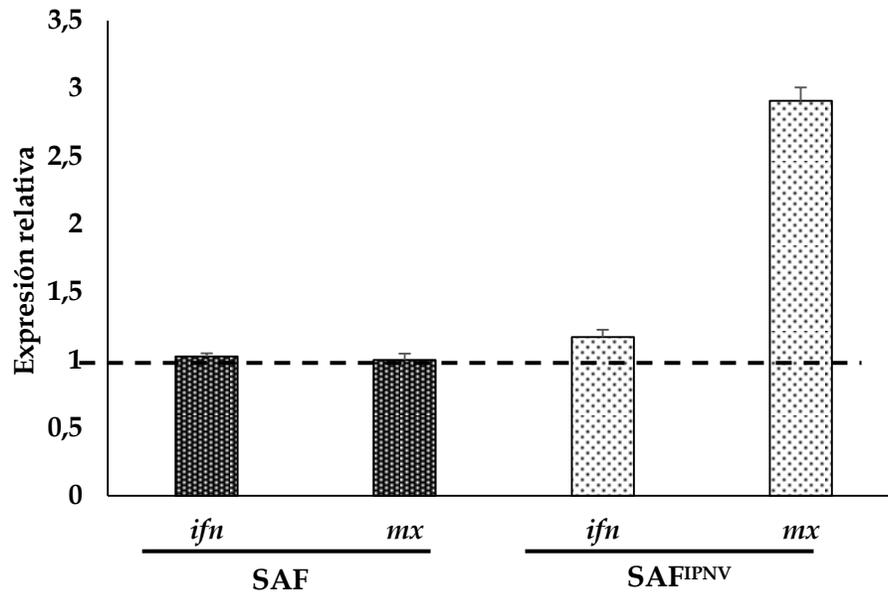
**Figura 18.** Sistema Transwell® de células SAF (diana) en co-cultivo con SAF, SAF<sup>IPNV</sup>, EPC y EPC<sup>IPNV</sup> (efectoras). La placa se infectó con VHSV (moi: 2.000 virus/pocillo) y tras 7 días se paró la infección fijando y tiñendo la monocapa celular con cristal violeta.

## 5. Análisis de la expresión de genes de resistencia en SAF<sup>IPNV</sup>

Los resultados obtenidos en el experimento anterior llevaron a pensar que los cultivos de SAF<sup>IPNV</sup> liberan al medio algún factor soluble que induce a cultivos de SAF resistencia a VHSV. Puesto que *in vitro* el único responsable posible de la resistencia es el sistema inmune innato, se estudió si el principal mecanismo de respuesta inmune innata frente a infecciones víricas, el sistema de Interferon tipo I, participaba de alguna manera en la resistencia observada. Así pues, se llevó a cabo una qPCR para analizar si los genes *ifn* y *mx* estaban expresados diferencialmente en el cultivo de SAF y en el persistentemente infectado. Los resultados se muestran en la **Figura 19**.

Como se puede observar en el gráfico, sí que existen diferencias en los niveles de expresión de *ifn* y *mx* entre el cultivo persistentemente infectado y el silvestre. En el caso de la línea

celular SAF, se observan que los niveles de *ifn* y *mx* son los mismos. En cambio, en la línea SAF<sup>FIPNV</sup> el gen del *ifn* está ligeramente sobreexpresado y el gen *mx* se expresa 3 veces más, comparado en ambos casos con las células SAF.



**Figura 19.** Expresión relativa de *IFN* y *Mx* en las células SAF y SAF<sup>FIPNV</sup>. Los niveles de expresión se midieron mediante qPCR y se expresaron respecto a un gen constitutivo, el *eF1 $\alpha$* .

## DISCUSIÓN

---

### *1. Relación entre la infección persistente de IPNV y la resistencia a VHSV: fenómeno de interferencia viral*

En el presente trabajo se investigó el fenómeno conocido como interferencia viral, esto es que la infección de un virus ofrece protección frente a un segundo virus similar o distinto del primero (si es distinto se denomina protección heteróloga). En trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio (I. García *et al.*, 2011) se había establecido y caracterizado una línea celular de EPC persistentemente infectada con IPNV (EPC<sup>IPNV</sup>). Estos estudios demostraron que dicha línea, en contraposición con la silvestre, presentaba resistencia a la superinfección con VHSV. Un comportamiento similar se demostró también en la línea celular SAF<sup>IPNV</sup> (R. Parreño, 2013). En el presente trabajo, se quiso demostrar que, tal como se pensaba, la resistencia observada frente VHSV se debía a la infección persistente con IPNV. Para ello se plantearon una serie de experimentos en los que mediante alta temperatura se inhibía la replicación de IPNV en cultivos EPC<sup>IPNV</sup> y SAF<sup>IPNV</sup>. Los resultados de estos experimentos demostraron que mientras se mantenga la replicación IPNV en las células EPC<sup>IPNV</sup>, éstas son resistentes a la infección por VHSV. Sin embargo, cuando aumentando la temperatura se bloquea la replicación de IPNV, el cultivo pierde la resistencia y se vuelve sensible a la infección. Los experimentos con la línea celular SAF no fueron tan concluyentes puesto que no se consiguió sembrar una monocapa confluyente de SAF<sup>IPNV</sup> con mas de un pase a alta temperatura. Sin embargo, la cantidad de RNA de IPNV en cultivos SAF<sup>IPNV</sup> con dos y tres pases a alta temperatura, sugiere un comportamiento similar al de las células EPC<sup>IPNV</sup>, es decir, a partir del segundo pase a alta temperatura es probable que el cultivo pierda la resistencia a VHSV.

Con estos experimentos se ha demostrado que la resistencia a VHSV en los cultivos de EPC y SAF depende de la replicación de IPNV. Estas observaciones obtenidas *in vitro*, guardan correlación con resultados descritos *in vivo*. En el trabajo de C. López-Vazquez *et al.*, 2016, se demostró que lenguados infectados primero con IPNV tienen mayor supervivencia tras una infección posterior con VHSV, que si se infecta a la inversa, concluyendo que existe una

interferencia viral clara entre estos dos virus. También se ha descrito (N. Byrne *et al.*, 2008) que truchas preinfectadas con IPNV y luego infectadas con IHNV (Virus de la Necrosis Hematopoyética Infecciosa) presentan una mortalidad significativamente menor (2%) que si son infectadas solo con IHNV (72%). Por tanto, los resultados descritos en este trabajo pueden ser perfectamente utilizados para desarrollar estrategias antivirales en dos grupos de peces de importancia acuícola: Cipriniformes y Perciformes.

## **2. Caracterización de la línea celular EPC<sup>IPNV</sup>**

La caracterización de la línea celular EPC<sup>IPNV</sup> es una tarea que ya se había empezado en distintos trabajos (I. García *et al.*, 2010; M. T. Jurado *et al.*, 2013; R. Parreño, 2013). En estos estudios se había demostrado que el título de IPNV en cultivos de EPC<sup>IPNV</sup> es tres órdenes de magnitud inferior al de cultivos EPC con infecciones estandar de dicho virus (R. Parreño, 2013). También se observó que esta línea celular mantiene durante meses una concentración constante de partículas víricas en su sobrenadante, y que la supervivencia celular tras muchos pases es prácticamente la misma que la de cultivos de EPC (R. Parreño, 2013). Finalmente se demostró que los cultivos de EPC<sup>IPNV</sup> son resistentes a la infección por el virus VHSV a una multiplicidad de 0.01 virus/célula y a una cepa del virus IPNV (la cepa Europea Ab) a la misma multiplicidad (I. García *et al.* 2010).

En este trabajo se analizó la resistencia de EPC<sup>IPNV</sup> a un rango más amplio de concentraciones de VHSV, demostrando que presenta resistencia hasta, por lo menos, una concentración de 0.1 virus/célula. También se analizó la resistencia de dicha línea a la cepa LW de IPNV, distinta a la que establece la infección persistente (cepa Sp) y a la ya estudiada anteriormente, la Ab (I. García *et al.* 2010). Los datos fueron similares a los del caso anterior: las células EPC<sup>IPNV</sup> resultaron ser resistentes hasta la concentración 0.1 virus/celula de IPNV-LW. Teniendo en cuenta que, para la infección con ambos virus, la supervivencia celular fue cercana al 80% con una concentración máxima de 0.1 virus/célula, no se puede descartar que la línea EPC<sup>IPNV</sup> pueda resistir también la infección con cantidades más elevadas de virus de las utilizadas en estos experimentos.

### ***3. Análisis de la resistencia inducida por cultivos persistentemente infectados con IPNV***

En investigaciones realizadas previamente en este laboratorio (M. T. Jurado *et al.*, 2013) se había observado que el sobrenadante o medio condicionado de cultivos de EPC<sup>IPNV</sup> confiere resistencia frente a VHSV a cultivos de EPC. En el presente trabajo se analizó si los sobrenadantes de cultivos EPC<sup>IPNV-LW</sup> y de SAF<sup>IPNV</sup> inducían en EPC la misma resistencia. Los resultados mostraron que el medio condicionado de EPC<sup>IPNV-LW</sup> sí genera resistencia contra VHSV. Esto puede deberse a que, aunque la infección persistente la establezcan cepas distintas (Sp y LW), el virus sigue siendo el mismo por lo que el mecanismo de interferencia viral con VHSV no varía. Podemos esperar por tanto, que cualquier cepa de IPNV pueda generar una línea celular EPC persistentemente infectada con las características de EPC<sup>IPNV</sup>. Por su parte, el sobrenadante de cultivos de SAF<sup>IPNV</sup> también confiere resistencia contra VHSV al cultivo de EPC, aunque en menor grado que los sobrenadantes de EPC<sup>IPNV</sup> y EPC<sup>IPNV-LW</sup>. Esto último parece coherente, puesto que al proceder de una línea celular distinta, es posible que los factores antivirales presentes en el sobrenadante de SAF<sup>IPNV</sup> no sean tan efectivos como los factores de la propia especie. No existen trabajos previos en los que se hayan utilizado medios condicionados de forma heteróloga, por lo que éste es un campo que está por explorar.

En los experimentos con medios condicionados de cultivos persistentemente infectados con IPNV sobre SAF, se observó que, al contrario de lo que ocurre con EPC, el medio condicionado de EPC<sup>IPNV</sup> y el de SAF<sup>IPNV</sup> apenas conferían resistencia a las células. El resultado con el sobrenadante de EPC<sup>IPNV</sup> era el esperado, puesto que al proceder de otra línea celular es probable que los factores antivirales presentes no tengan efecto en las células SAF y de ahí la baja supervivencia. Sin embargo, la escasa protección obtenida con el sobrenadante de SAF<sup>IPNV</sup> fue inesperada, ya que al proceder de la misma línea celular se presupuso que induciría una protección similar a la que el medio condicionado de EPC<sup>IPNV</sup> induce en células EPC. Una posible explicación sería considerar que las células SAF<sup>IPNV</sup> no liberan al medio factores antivirales a una concentración suficiente como para inducir una fuerte resistencia a VHSV. Así pues, a pesar de que ellas mismas son resistentes, no son capaces de inducir una

clara resistencia a células SAF. Esto concuerda con los resultados observados con el medio condicionado de SAF<sup>IPNV</sup> sobre EPC, donde se vio también una menor resistencia en comparación con los sobrenadantes de EPC<sup>IPNV</sup> y EPC<sup>IPNV-LW</sup>. En cualquier caso, sería necesario realizar más experimentos para verificar esta hipótesis.

Tras estos experimentos se planteó la posibilidad de que los cultivos persistentemente infectados liberaran al medio algún tipo de factor soluble con actividad antiviral que induce resistencia frente a VHSV en cultivos silvestres. Con el objetivo de estudiar la interacción entre cultivos silvestres y los persistentemente infectados, se co-cultivó mediante el sistema Transwell® células SAF con SAF<sup>IPNV</sup> y EPC<sup>IPNV</sup>. Los resultados corroboraron la hipótesis planteada pues se encontró que las células SAF en co-cultivo con las líneas persistentemente infectadas adquirirían resistencia parcial a VHSV. La resistencia inducida por la línea EPC<sup>IPNV</sup> no se había descrito todavía en sistemas de co-cultivo pero la de SAF<sup>IPNV</sup> concuerda con los resultados de S. Torres, 2015.

Finalmente, se estudiaron dos genes (*ifn* y *mx*) implicados en la respuesta inmune innata en la línea SAF<sup>IPNV</sup> como posibles responsables de la inducción de resistencia a VHSV en cultivos de EPC y SAF. Se midió mediante qPCR la expresión de dichos genes, encontrándose una ligera sobreexpresión de *ifn* y tres veces más de expresión de *mx*, ambos respecto a células SAF. Esta diferencia de expresión entre los dos genes concuerda con el lugar que ocupan en la cascada de transducción de señales del Interferon tipo I: *ifn* actúa como factor de transcripción de *mx* (véase **Figura 2**). Así, una ligera sobreexpresión del factor de transcripción consigue un efecto amplificado en el gen diana. Por tanto, los resultados descritos llevan a pensar que la infección persistente establecida por IPNV en los cultivos EPC<sup>IPNV</sup> y SAF<sup>IPNV</sup> activa de alguna manera el sistema del Interferón tipo I, estimulando la liberación de factores antivirales como la proteína Mx. Estos factores antivirales, inducen un estado de resistencia en células control, haciendo que estas se vuelvan resistentes a VHSV. Estos resultados son similares a los descritos por R. Pakingking *et al.*, 2008, quienes concluyen que las proteínas Mx juegan un papel importante en el establecimiento de un estado antiviral en las células. También se ha descrito la inducción del sistema de Interferon como respuesta

a IPNV, tanto en cultivos celulares (S. R. Saint-Jean *et al.*, 2010) como *in vivo* en salmones (S. Reyes-Cerpa *et al.*, 2012).

A modo de conclusión, podemos decir que la interferencia heteróloga inducida por IPNV no se restringe a la línea celular EPC, sino que es un fenómeno general en peces, cosa que lo convierte en una atractiva estrategia antiviral en el campo de la acuicultura.

## CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

---

A modo de conclusión se puede decir que en este trabajo:

1. Se ha generado una línea celular de dorada persistentemente infectada con IPNV (SAF<sup>IPNV</sup>) con las mismas propiedades que las EPC<sup>IPNV</sup>.
2. Se ha demostrado que en EPC<sup>IPNV</sup> y en SAF<sup>IPNV</sup> la interferencia viral con VHSV es estrictamente dependiente de IPNV.
3. Se ha profundizado en la caracterización de la línea celular EPC<sup>IPNV</sup>, demostrando que presenta resistencia a la infección con VHSV y con IPNV-LW hasta, por lo menos, una concentración de 0.1 virus/célula.
4. Se ha constatado la presencia de factores antivirales en los medios condicionados de EPC<sup>IPNV</sup> y SAF<sup>IPNV</sup> y se ha demostrado que su actividad es mayor cuando se administran a células de la misma especie (homólogo) que cuando se hace a células de otra especie (heterólogo).
5. Se han encontrado evidencias de que la ruta del Interferón tipo I es la responsable de la liberación de factores antivirales al medio capaces de inducir resistencia a VHSV en cultivos de EPC y SAF.

En cuanto a futuros pasos, cabría estudiar la duración de la interferencia viral una vez eliminado el virus por aumento de temperatura y caracterizar en mayor profundidad la línea SAF<sup>IPNV</sup>. Se podría investigar qué moléculas de los medios condicionados son las responsables de la inducción de resistencia así como cuantificar la expresión de genes de la respuesta inmune innata en las células diana del sistema de co-cultivo. Finalmente, se podría intentar establecer infecciones persistentes de IPNV en pez para estudiar el fenómeno de interferencia viral *in vivo*.

## REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA

---

- Ballesteros, N., S. Rodríguez, S. I. Pérez-Prieto.** 2015. *Immune responses to oral pcDNA-VP2 vaccine in relation to infectious pancreatic necrosis virus carrier state in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss**. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 165:127-137.
- Bootland, L. M., P. Dobos, R. M. W. Stevenson.** 1991. *The IPNV carrier state and demonstration of vertical transmission in experimentally infected brook trout*. *Diseases in Aquatic Organisms* 10:13-21.
- Byrne, N., J. Castric, J. Cabon, C. Quentel.** 2008. *Study of the viral interference between infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)*. *Fish and Shellfish Immunology*. 24: 489-497.
- Chen, Y. M., Y.L. Su, P. S. Shie, S. L. Huang, H. L. Yang, T. Y. Chen.** 2008. *Grouper Mx confers resistance to nodavirus and interacts with coat protein*. *Developmental and Comparative Immunology* 32:825-836.
- Essbauer, S., W. Ahne.** 2001. *Virus of Lower Vertebrates. Zoonoses and public health*. 48: 403-475.
- Fernández-Trujillo, M. A., E. García-Rosado, M. C. Alonso, D. Castro.** 2013. *Mx1, Mx2 and Mx3 proteins from the gilthead seabream (*Sparus aurata*) show in vitro antiviral activity against RNA and DNA viruses*. *Molecular Immunology*. 56:630-636.
- García, I., A. Galiana, A. Falcó, A. Estepa, L. Pérez.** 2011. *Characterization of an infectious pancreatic necrosis (IPN) virus carrier cell culture with resistance to superinfection with heterologous viruses*. *Veterinary Microbiology*. 149: 48-55.
- Goodwin, A. E., G. E. Merry, and A. D. Noyes.** 2012. *Persistence of viral RNA in fish infected with VHSV-IVb at 15°C and then moved to warmer temperatures after the onset of disease*. *Journal of fish diseases* 35: 523-528.
- Haller, O., P. Staeheli, G. Kochs.** 2007. *Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense*. *Biochimie*. 89: 812-818
- Julin, K., L. H. Johansen, A.-I. Sommer, J. B. Jorgensen.** 2014. *Persistent infections with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) of different virulence in Atlantic salmon, *Salmo salar**. *Journal of Fish Diseases* doi: 10.1111/jfd.12317.
- Jurado, M. T., P. García-Valtanen, A. Estepa, L. Pérez.** 2013. *Antiviral activity produced by an IPNV-carrier EPC cell culture confers resistance to VHSV infection*. *Veterinary Microbiology* 166: 412-418.
- Kotob, M. H., S. Menanteau-Ledouble, G. Kumar, M. Abdelzaher, M. El-Matbouli.** 2016. *The impact of co-infections on fish: a review*. *Veterinary Research*. 47:98.

**López-Vázquez, C., M. C. Alonso, C. P. Dopazo, I. Bandín.** 2016. *In vivo study of viral haemorrhagic septicaemia virus and infectious pancreatic necrosis virus coexistence in Senegalese sole (Solea senegalensis)*. Journal of fish diseases. Doi: 10.1111/jfd.12585

**Martin-Armas, M., A.I. Sommer, B. Smedsrod.** 2007. *Studies on uptake and intracellular processing of infectious pancreatic necrosis virus by Atlantic cod scavenger endothelial cells*. J. Fish Diseases 30: 701-710

**Pakingking, R., Y. Okinaka, K. Mori, M. Arimoto, K. Muroga, T. Nakai.** 2004. *In vivo and in vitro analysis of the resistance against viral hemorrhagic septicemia virus in Japanese flounder preceedingly infected with aquabiernavirus*. Fish & shellfish immunology. 17: 1-11.

**Parreño, R.** 2013. *Caracterización de fenómenos de interferencia viral en líneas celulares de pez*. TFG por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad Miguel Hernández de Elche.

**Parreño, R., S. Torres, L. Almagro, M. Belló-Perez, A. Estepa, L. Pérez.** 2016. *Induction of viral interference by IPNV-carrier cells on target cells: A cell co-culture study*. Fish & Shellfish Immunology. 58: 483-489.

**Reno, P. W.,** 1999. *Infectious pancreatic necrosis virus and its virulence*. Fish Diseases and Disorders. V: 3 P: 1-55.

**Reyes-Cerpa, S., F. Reyes-López, D. Toro-Ascuy, J. Ibañez, K. Maisey, A. M. Sandino, M. Imarai.** 2012. *IPNV modulation of pro and anti-inflammatory cytokine expression in Atlantic salmon might help the establishment of infection and persistence*. Fish and Shellfish Immunology. 32: 291-300.

**Saint-Jean, S. R., A. I. de las Heras, S. I. Pérez-Prieto.** 2010. *The persistence of infectious pancreatic necrosis virus and its influence on the early immune response*. Veterinary Immunology and Immunopathology 136:81-91.

**Torres, S.** 2015. *Establecimiento de sistemas de co-cultivo celular para el estudio de la respuesta antiviral en líneas celulares de pez*. TFG por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad Miguel Hernández de Elche.

**Verrier, E. R., C. Langevin, C. Tohry, A. Houel, V. Ducrocq, A. Benmansour, E. Quillet, P. Boudinot.** 2012. *Genetic resistance to rhabdovirus infection in teleost fish is paralleled to the derived cell resistance status*. Plos one. V:7, I:4, e33935.