

FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS BALSAS LIPÍDICAS (*LIPID RAFTS*) EN LA ENTRADA DE RHABDOVIRUS DE PECES A LA CÉLULA

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Diciembre 2017

Autor: Elena Bonmatí Seva

Modalidad: Experimental

Tutor: Luis Pérez García-Estañ

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6-11
1. Situación actual de la acuicultura.....	6-7
2. Virus: SVCV y VHSV.....	7-8
3. Ciclo de replicación: Entrada de los Rhabdovirus a la célula.....	8-9
4. Importancia del colesterol y las balsas lipídicas.....	10-11
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	12-13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14-19
1. Cultivos celulares.....	14
1.1 Líneas celulares y medios de cultivo.....	14
2. Ensayo de citotoxicidad: Ensayo MTT.....	14-15
3. Virus: Protocolo de infección.....	15
3.1 Titulación (efecto citopático).....	15
3.2 Efecto directo de la MBCD sobre el virus.....	15
4. Titulación de la monocapa celular.....	16
4.1 Tinción con cristal violeta.....	16
4.2 Tinción de Giemsa.....	16
4.3 Medida de densidad óptica.....	16
5. PCR cuantitativa.....	17-18
5.1 Extracción de RNA.....	17
5.2 Síntesis de cDNA (retrotranscripción).....	17
5.3 PCR cuantitativa (PCR en tiempo real).....	17-18
6. Inmunofluorescencia indirecta.....	18
7. Citometría de flujo.....	19
8. Estadística.....	19
RESULTADOS.....	20-27
1. Toxicidad de MBCD sobre células EPC.....	20-21
2. Efecto directo de la MBCD sobre SVCV.....	21-22
3. Efecto del pretratamiento de las células EPC con MBCD en la infección con SVCV.....	23-24
4. Síntesis de RNA y proteínas de SVCV en células tratadas con MBCD.....	25-26
5. Efecto del pretatamiento con MBCD en la infección con VHSV.....	26-27

DISCUSIÓN.....	28-32
1. Estudio del papel de las balsas lipídicas en la entrada de SVCV en la célula hospedadora.....	28-30
2. Efecto “doble” de la MBCD.....	31
3. Comparación del efecto de MBCD sobre SVCV y sobre otros Rhabdovirus de pez: VHSV.....	32
CONCLUSIONES.....	33
BIBLIOGRAFÍA.....	34-36



ABREVIATURAS

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

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

MBCD: Metil-beta-ciclodextrina

DMSO: Dimetilsulfóxido

RPMI: Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute

TRK: Tampón de lisis

SVCV: Virus de la Viremia Primavera de la Carpa

VHSV: Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral

VSV: Virus de la estomatitis vesicular

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

Rt: retrotranscripción

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: PCR cuantitativa

Rt-qPCR: PCR cuantitativa con transcripción inversa

Moi: Multiplicidad de infección

d.p.i: Días post infección

u.f.c: Unidades formadoras de calvas

f.f.u: Unidades formadoras de focos

RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

Las enfermedades virales afectan muy negativamente al desarrollo de la acuicultura, y específicamente las causadas por los Rhabdovirus. Entre ellos destaca el virus de la Viremia Primavera de la Carpa (SVCV), por ser uno de los virus que ocasiona mayores pérdidas económicas. Es interesante encontrar inhibidores de los pasos del ciclo de replicación de un virus, el primero de los cuales es la entrada. Es por ello que en este trabajo se realizó un estudio del papel de las balsas lipídicas en la entrada de Rhabdovirus de peces a la célula. Se probó el efecto de MBCD sobre la replicación del virus (SVCV) en una línea celular de carpa (EPC) para comprobar si reducía la infectividad del virus. Nuestros resultados sugieren: A baja concentración de metil-beta-ciclodextrina (MBCD) perturba la membrana celular, facilitando la entrada del virus, mientras que a alta concentración de MBCD desorganiza los lipid rafts inhibiendo la entrada del virus. MBCD también tiene un efecto directo (virucida) sobre SVCV. Se determinó también la actividad de MBCD frente al virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV).

Palabras clave: Acuicultura, enfermedades de peces, SVCV, MBCD.

Viral diseases pose a threat to the aquaculture industry. Fish rhabdoviruses are one of the most widespread groups of pathogens in fish. Spring viremia of carp virus (SVCV) infections of carp cause significant economy losses. The objective of this study was to investigate the role of the lipid rafts in SVCV entry to the cells. The effect of MBCD on SVCV infection was tested on the EPC cell line. We observed a two-fold activity of MBCD: low concentrations of MBCD enhanced SVCV infection but at high MBCD doses, SVCV infectivity was inhibited. MBCD was also assayed on other fish rhabdovirus (VHSV), but we did not find any significant activity.

Keywords: Aquaculture, fish diseases, SVCV, MBCD.

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 supero por primera vez la de pescado capturado en el medio natural (**Figura 1**), alcanzando una producción de 73,8 millones de toneladas.

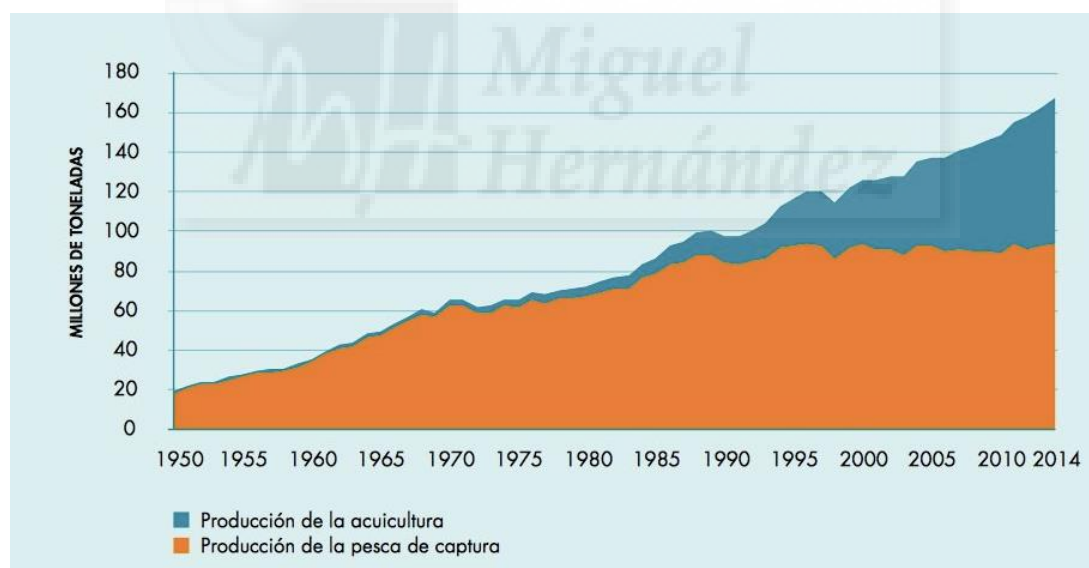


Figura 1. Evolución de la producción de acuicultura y pesca mundial desde 1950 hasta 2014 (FAO 2016, El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016).

Pese a estos datos tan favorables, la industria de la acuicultura ve comprometida su producción por enfermedades de origen bacteriano y vírico. Las enfermedades virales son algunas de las que más afectan el desarrollo de la acuicultura, y específicamente las causadas por los Rhabdovirus, entre estos destaca el virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV), por ser

unos de los virus que ocasiona mayores pérdidas económicas. 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. Virus: SVCV y VHSV

Los virus que vamos a estudiar pertenecen a la familia Rhabdoviridae, virus con genoma RNA que causan en peces diversas enfermedades, algunos de ellos de obligada declaración a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (**Tabla 1**).

Genoma	Virus	Familia
RNA	Virus de la viremia primaveral de carpa (SVCV)	Rhabdoviridae
	Virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV)	

Tabla 1. Virus que causan en peces enfermedades de obligada declaración a la OIE en vigor en 2017

El virus de la Viremia Primaveral de la Carpa (SVCV) pertenece a la familia Rhabdoviridae y al género *Spirivirus*. Su genoma es una cadena de RNA (monocatenario) no segmentado con polaridad de anti-mensajero (1) (2) y consta de 11.019 nucleótidos que codifican cinco proteínas en el siguiente orden: una nucleoproteína (N), una fosfoproteína (P), una proteína matriz (M), una glicoproteína (G) y una polimerasa RNA dependiente del RNA (L). Además, carece de un gen no virión (NV) entre los genes G y L como el que se encuentra en los Rhabdovirus del género *Novirhabdovirus*. La enfermedad que causa es contagiosa para *Ciprínidos* e *Ictalúridos* y varias especies de carpa.

El virus de la Septicemia Hemorrágica Viral (VHSV) pertenece al género *Novirhabdovirus*. Se trata de un virus con envuelta y con genoma de RNA negativo monocatenario. Dicho genoma codifica seis proteínas: N, P, M, G, NV y L. Este virus es capaz de infectar por lo menos a 50 especies de peces en agua dulce y marina en salmónidos, causando una enfermedad sistémica grave, la septicemia hemorrágica.

Tanto SVCV como VHSV son capaces de infectar líneas celulares de pez, como las EPC, causando infección lítica con efecto citopático y una elevada muerte celular (3).

3. Ciclo de replicación: Entrada de los Rhabdovirus a la célula

Los Rhabdovirus son virus que tiene forma de bala (**figura 2**), de 175 por 75 nm. Su cápside es helicoidal, contiene RNA de una sola cadena y de polaridad negativa, con envoltura lipídica. En la membrana está insertada la glicoproteína G, en un nivel un poco más profundo la proteína de matriz M, y en la nucleocápside se encuentran tres proteínas: N, P y L.

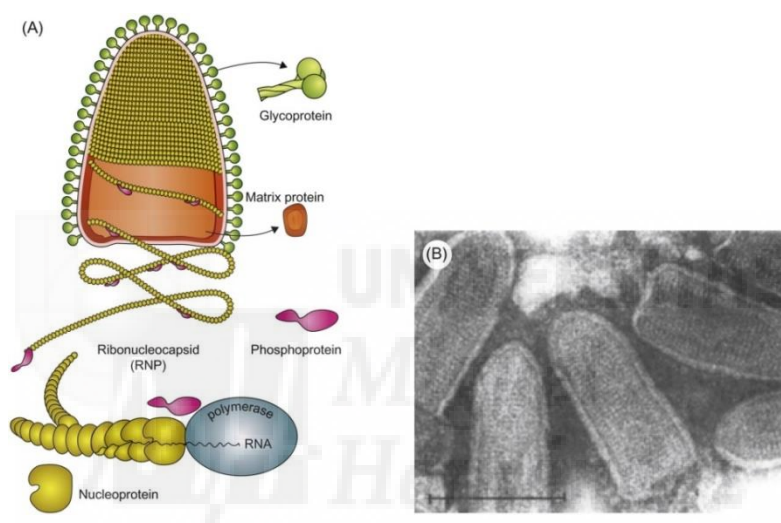


Figura 2. Familia Rhabdoviridae. (A) Diagrama que ilustra un virión de rhabdovirus y la estructura de la nucleocápsida. (B) Imagen al microscopio electrónico del Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV) mostrando viriones característicos en forma de bala. Imagen tomada de publicación de Veterinay Research

La infección de un Rhabdovirus comienza por la unión de la glicoproteína G de la envuelta del virus a receptores específicos en la membrana plasmática de la célula huésped, lo que induce un proceso de endocitosis. A continuación, tiene lugar la fusión de la membrana viral y la del endosoma que es dependiente de pH. Tras la fusión, la nucleocápsida libera el RNA en el citoplasma celular. La replicación tiene lugar en el citoplasma de las células infectadas y los viriones maduran y brotan por gemación de la superficie celular llegando a lisis la célula.

El ciclo de replicación se lleva a cabo en el citoplasma de la célula, mediante la RNA polimerasa viral (L + P). El virus, mediante la proteína G, se

adhiera al receptor de las células del sistema nervioso central, ya que la proteína G es la responsable de la adhesión del virus a la membrana de la célula. A continuación el virus entra por endocitosis, la nucleocápside alcanza el citoplasma y empieza la transcripción (mediante la proteína L). Pasado este proceso se generan mRNA y se produce la traducción en los ribosomas, que sigue con la glicosilación de la proteína G. Esta proteína se inserta en la membrana del retículo endoplasmático y luego en la membrana citoplasmática. Este evento es señal para la proteína M, que se acopla en el dominio de la proteína G. Ahora la RNA polimerasa (proteína L), produce copias de genoma viral. Finalmente se forman las nucleocápsidas y se desplazan a la membrana las proteínas G y M, donde se ensamblan los viriones y éstos salen de la célula por gemación.

Cualquiera de los pasos del ciclo de replicación, incluida la entrada, puede ser diana de compuestos antivirales.

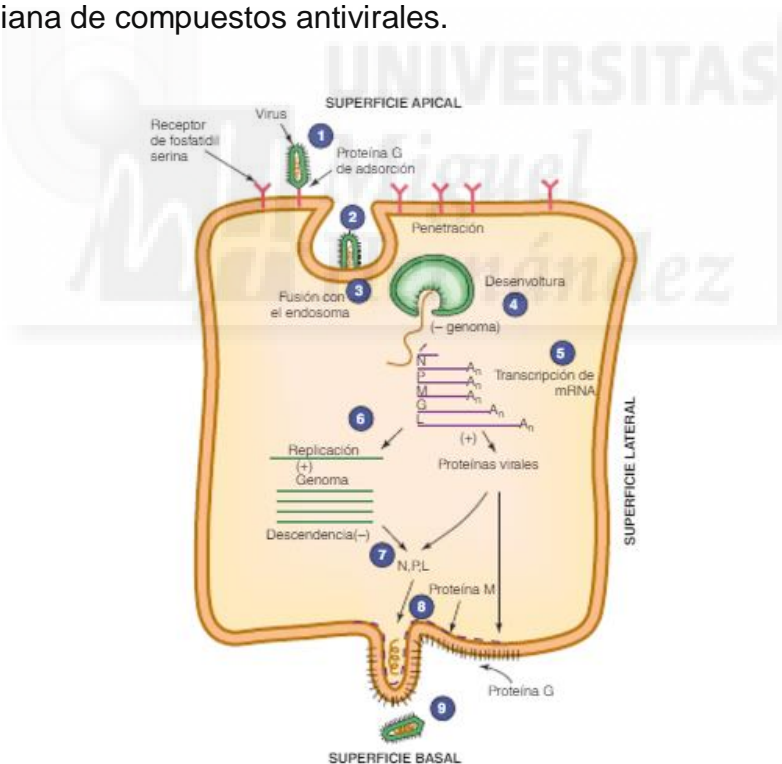


Figura 3. Pasos en el ciclo de replicación de un Rhabdovirus: (1) Adherencia del virus; (2) penetración a un endosoma; (3) fusión del virus con la membrana endosómica; (4) desensamblaje de la nucleocápside; (5) producción de los mRNAs del virus; (6) RNA de polaridad positiva que sirve de plantilla para la síntesis de genoma viral; (7) el RNA de polaridad negativa se incorpora en las nucleocápsides (N); (8) las nucleocápsides se unen a la proteína de la matriz (M) en la superficie celular; (9) gemación del virus a partir de la superficie celular. Imagen tomada de Microbiología Médica Jawetz 25ed.

4. Importancia del colesterol y las balsas lipídicas

Las Balsas Lipídicas (lipid rafts) son microdominios de la membrana que se encuentran enriquecidos en colesterol y esfingolípidos (**Figura 4**). Presentan una cantidad mayor de lípidos con cadenas de ácidos grasos saturados en comparación con el resto de la membrana plasmática. Parecen ser pequeños en tamaño pero pueden llegar a constituir una gran fracción de la membrana plasmática y por este motivo son visibles por microscopia de fuerza atómica (4).

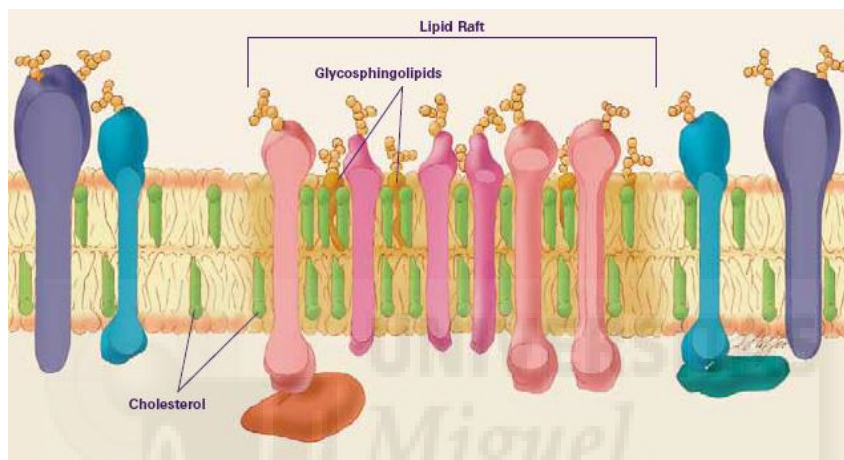


Figura 4. Diagrama de una Balsa Lipídica dentro de una membrana celular. Imagen tomada de Pike L., 2003.

La importancia de las balsas lipídicas en transducción de señales ha sido demostrada en diversos experimentos en los cuales se ha eliminado el colesterol de la membrana mediante tratamientos químicos. La exclusión del colesterol conlleva la destrucción de las balsas lipídicas y, como consecuencia, se observa la interrupción de la señalización a través de membrana (4).

La evidencia bioquímica y microscópica avala la existencia de “rafts” lipídicos en las membranas naturales. Estos rafts pueden ser desestabilizados por MBCD, que reduce el colesterol de membrana; tal descubrimiento indica la importancia del colesterol en el mantenimiento de la integridad de los lipid rafts. Además del mayor contenido en colesterol y esfingolípidos, los rafts lipídicos están enriquecidos en muchos tipos de proteínas receptoras de la

superficie celular, así como en muchas proteínas señalizadoras que se unen a los receptores y son activadas por ellos.

Se ha comprobado que otros agentes secuestradores de colesterol, como la filipina o la nistatina, perturban seriamente la membrana mediante la formación de grandes estructuras de poro (20-25 nm). Además, debe tenerse en cuenta que la modulación de los niveles de colesterol produce también alteraciones que no necesariamente tienen que ver con los lipid rafts, como por ejemplo la liberación de algunas proteínas pequeñas de unión al colesterol de la membrana. El nivel de colesterol en la membrana también puede ser modulado mediante la inhibición de la biosíntesis o la oxidación del colesterol.



ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El modelo elegido en este trabajo para estudiar la interacción de un virus de pez con la membrana de la célula ha sido el SVCV, porque representa a una familia de virus (Rhabdovirus) causantes de numerosas enfermedades que provocan enormes pérdidas en la producción piscícola mundial y su biología molecular es una de las mejor conocidas (2). Este estudio se centra en el primer paso del ciclo de replicación: la entrada de virus a la célula (5). En este paso de entrada se produce la fusión de membranas virus-hospedador que origina la liberación del genoma viral en el interior de la célula. Tal y como se ha demostrado para otros virus, el estudio de la fusión puede ayudar en el diseño de agentes terapéuticos para frenar la infección (6).

En investigaciones previas llevadas a cabo en este grupo de investigación (7) (8), se estudiaron las propiedades de la entrada de VHSV a la célula. Dicho proceso es mediado por la fusión de membranas dependientes de pH que se produce en el endosoma. Se había observado que la unión de un péptido derivado de la proteína de la envoltura del virus (p5) a VHSV a pH fisiológico produce cambios conformacionales similares en la proteína G que los producidos a pH bajo, cambios que son necesarios para la fusión regular de VHSV a células. Un aumento de la fusión virus/célula a pH fisiológico podría explicar la mejora observada en la infectividad de VHSV al permitir la entrada del virus directamente a través de la membrana plasmática, independientemente de la entrada de virus a través de endocitosis.

Existen diversos estudios centrados en el efecto de la retirada del colesterol celular sobre la infección por algunos Rhabdovirus. En concreto, el agente más usado para reducir el colesterol de cultivos es la MBCD. El colesterol es un componente estructural crítico de las balsas lipídicas, y el agotamiento conduce a la desorganización de los microdominios de la balsa lipídica. No obstante, este agotamiento parece tener diferentes efectos dependiendo del virus. En el caso del virus de la gripe, se ha demostrado que el agotamiento del colesterol de la envoltura viral causa disminuciones en la

infectividad (9). Sin embargo, este mismo agotamiento inactiva el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (HIV-1) y el virus de inmunodeficiencia en simios (SIV) (10).

El uso de MBCD y derivados para modular reversiblemente el nivel de colesterol de la membrana parece ser una herramienta conveniente y reproducible para perturbar la integridad de los lipid rafts sin ocasionar daños graves en la membrana celular, y poder estudiar la entrada de virus en tales condiciones.

El planteamiento inicial para este trabajo fue **determinar la importancia de los lipid rafts en la entrada de los Rhabdovirus de pez en la célula**. Para alcanzar dicho objetivo general, se fijaron los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la toxicidad de MBCD sobre células EPC.
2. Comprobar si el tratamiento directo de SVCV con MBCD repercute en su infectividad.
3. Comprobar si el pretratamiento con MBCD de las células EPC tiene efecto sobre la infectividad de SVCV.
4. Comprobar si el pretratamiento con MBCD de las células EPC tiene efecto sobre la infectividad de VHSV.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares

1.1 Líneas celulares y medios de cultivo

En este trabajo se utilizó la línea celular EPC (Epitelioma Papillosum Cyprini). Estas células se mantuvieron a 28°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y en medio celular RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen Corporation, UK) que contiene un 10% de suero fetal bovino (FCS) (Sigma, St. Louis, USA), 1mM de piruvato (Gibco, Invitrogen Corporation, UK), 2mM glutamina (Gibco), 50µg/ml gentamicina (Gibco) y 2µg/ml Fungizona® (Anfotericina B). 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%.

2. Ensayo de citotoxicidad: Ensayo MTT

Para determinar el nivel de toxicidad de la metil-beta-ciclodextrina (MBCD, Sigma) sobre las células EPC, se utilizó el ensayo de MTT, que permite determinar el porcentaje de viabilidad celular.

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.

En primer lugar, se sembraron 30.000 células por pocillo y se dejaron 24 horas a 28°C gaseadas con CO₂. Una vez confluentes, se añadieron 100 µl por pocillo de MBCD a concentraciones crecientes (0; 500µM; 1mM; 2mM; 5mM; 7mM; 10mM; 15mM; 20mM) y se incubaron a 22°C durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo, se trataron las células con 25 µl de MTT, a una concentración de 1,9 mg/ml durante 3 horas a 28°C. Pasadas las 3 horas, se

retiró el reactivo y se añadió 100 µl de Dimetilsulfóxido (DMSO). El DMSO se dejó actuar durante 30 minutos a 28°C. Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 570 nm.

3. Virus: Protocolo de infección

Se utilizaron dos tipos de rhabdovirus: VHSV (Virus de la septicemia hemorrágica viral) cuya infección se desarrolla a 14°C; y SVCV (Virus de viremia primaveral de la carpa), cuyas infecciones transcurren a 22°C. Para las infecciones con los dos virus el medio utilizado fue RPMI 2%.

3.1 Titulación (efecto citopático)

Monocapas de células EPC fueron crecidas hasta alcanzar una confluencia del 100% en placas de 96 (p96) o 24 pocillos (p24). Estas células fueron tratadas con 1,5; 3,5 mM, 7mM o 10 mM de MBCD durante 2h a 22°C y, posteriormente, infectadas con SVCV a una MOI de 10^{-4} . Tras 1,5 h, el virus fue retirado y las monocapas se cubrieron con una solución de medio de cultivo con un contenido del 2% de metil-celulosa (Sigma). Las placas se incubaron a 22°C durante 5 días, tras los cuales se retiró el medio con la metil-celulosa. Finalmente, los pocillos se tiñeron con cristal violeta durante al menos una hora para contar calvas. El título se calculó mediante la siguiente formula: (Número de calvas * factor de dilución) / Volumen.

3.2 Efecto directo de la MBCD sobre el virus

En este ensayo se trató el virus con concentraciones crecientes de MBCD (3,5; 7 y 10mM) en un paso previo a la infección con el fin de determinar si la MBCD tiene cierto efecto sobre la capacidad de infección del virus.

La MBCD se diluyó junto con el virus en RPMI 2% hasta la concentración a la cual queríamos determinar su efecto (MOI: 10^{-4}). Se dejaron actuar durante 2h a 22°C y, transcurrido ese tiempo, se añadieron 300 µL por pocillo de la mezcla preparada y se incubó de nuevo durante 90 minutos a 22°C para observar el efecto citopático.

4. Tinción de la monocapa celular

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 μL 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_2O destilada y se deja secar.

4.2 Tinción de 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 glaciado 100% (100 μL por pocillo) a temperatura ambiente. A continuación se añaden 75 μL por pocillo de giemsa y se deja incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se retira el giemsa con H_2O destilada y se deja secar la placa.

4.3 Medida de densidad óptica

Para obtener una medida cuantitativa de los resultados, se realizó una medición espectrofotométrica. Para ello, tras la tinción, se añadieron 100 μL 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.

5. PCR cuantitativa

5.1. Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó utilizando el Kit E.Z.N.A Total RNA (Omega Bio-Tek, R6688) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. El RNA eluido se cuantifica en ng/ μ l mediante espectrofotometría (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific). Finalmente el RNA se almacena a -80°C hasta su uso.

5.2 Síntesis de cDNA (retrotranscripción)

Para la obtención del cDNA, el RNA extraído se incubaba, usando un termociclador (GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems), con 0.5 μ l de hexámeros aleatorios (~90 ng) (Roche) y 1 μ l de una mezcla 10 mM de deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs, Roche) durante 5 min a 65°C . Tras la incubación se añaden 4 μ l de *5X first standard buffer* (250 mM Tris- HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) (Invitrogen), 2 μ l de 0.1 M ditioneitol (DTT, Invitrogen), 0.5 μ l de inhibidor de 20U/ μ l RNAsa (Applied Biosystem) y 0.5 μ l de transcriptasa inversa MMLV. Esta última mezcla se incubaba durante 10 min a 25°C , seguidamente durante 50 min a 37°C y posteriormente durante 15 min a 70°C . El cDNA obtenido se almacena a -20°C hasta su uso.

5.3 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 μ L que contiene 2 μ L del cDNA sintetizado previamente, 300 nM de cada cebador y 10 μ L de SYBR Green Master Mix. 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 del EF1 α (gen endógeno). El análisis de la expresión génica se realizó mediante el método donde ΔCt se determina sustrayendo el valor Ct del gen EF1 α al valor del Ct objetivo. Las secuencias de los cebadores utilizados en los ensayos se muestran en la **Tabla 2**.

Gen	Referencia	Secuencia
EPC-EF1 α	GenBank NM 131263	F: CCACGTCGACTCCGGAAA R: CGATTCCACCGCATTGTGAAGA
N-SVCV	GenBank AJ318079.1	F: GCATTATGCCGCTCCAAGAG R: AGCTTGCATTGAGATCGACATT

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados como cebadores para el análisis de PCR

6. Inmunofluorescencia indirecta

Monocapas de células EPC fueron crecidas hasta alcanzar una confluencia del 100% en placas de 96 (p96). Estas células fueron tratadas con 7mM o 10mM de MBCD durante 2h a 22°C y, posteriormente, infectadas con SVCV a una MOI de 10⁻⁴. Tras 90 minutos, el virus fue retirado y las monocapas se cubrieron con una solución de medio de cultivo RPMI 2%. Las placas se incubaron a 22°C durante 24 horas, tras ese periodo de incubación las células fueron fijadas con formalina 4% en PBS durante 20 minutos y, a continuación, se comenzó la inmunofluorescencia.

Para la realización de la inmunofluorescencia indirecta, las células se incuban durante una hora a temperatura ambiente con tampón bloqueante compuesto por 1% BSA (Sigma) y 0.5% Triton (Sigma) diluidos en PBS. Una vez pasado el tiempo, se retira la solución de bloqueo y acto seguido se pasa a poner el anticuerpo primario anti SVCV, diluido en solución de bloqueo, que se incubará durante 24 horas. Posteriormente, tras 3 lavados con PBS, las células se incuban con el anticuerpo secundario conjugado a fluorescencia (GAM-FITC, Anticuerpo producido en conejo AF-488) durante 1 hora sin luz, para evitar el desgaste de los fluorocromos conjugados al anticuerpo. Tras la incubación, se retira el anticuerpo secundario y se procede a hacer lavados con PBS, eliminando los posibles restos que nos pudiesen dar lugar a fondo. Las monocapas de células fueron observadas y fotografiadas con equipo Incell (Analyzer 6000, Cell image system; GE Healthcare).

7. Citometría de flujo

La citometría de flujo es un método analítico que mide la emisión de fluorescencia y la dispersión de la luz de células frente a un haz de luz láser. En este estudio la citometría nos permite diferenciar qué porcentaje de la población de células EPC se encuentra infectado con SVCV y cuál no.

Tras la realización de la inmunofluorescencia indirecta (descrita en el apartado 6), se realizaron 3 lavados con PBS y se tripsinizaron las células, las cuales quedaron en suspensión en una placa de 96 pocillos. La placa de 96 pocillos se introdujo en un citómetro de flujo BD FACSCanto II (BectonDickinson). Los archivos .fcs fueron analizados con el programa Flowing Software v.2.5.1.

En este programa, en el archivo .fcs del control positivo (células EPC infectadas con SVCV sin MBCD) seleccionamos dos poblaciones celulares una de las cuales tiene señal FITC, que se corresponde con la población infectada y, otra población sin esta señal de fluorescencia, lo que afirma que no presenta infección.

8. Estadística

Todos los datos se representan como la media \pm error estándar del número de experimentos. Se consideran diferencias estadísticas significativas cuando al realizar la prueba t de student el valor de p es $\leq 0,05$ (*:p $\leq 0,05$; **:p $\leq 0,01$; ***:p $\leq 0,001$).

Para la realización de las estadísticas de este trabajo se utilizó el programa PrismSoftware 5.0 GraphPad.

RESULTADOS

1. Toxicidad de MBCD sobre células EPC

La metil-beta-ciclodextrina (MBCD) es un oligosacárido cíclico (**figura 5**) con estructura rígida en forma de rosquilla que la convierte en un agente complejo natural. Es un reactivo que se utiliza para aumentar la solubilidad de sustancias no polares, como ácidos grasos, lípidos, vitaminas y colesterol, para su uso en aplicaciones de cultivo celular. Induce la liberación de colesterol a partir de balsas lipídicas ricas en colesterol situadas en la superficie de las células, lo que la convierte en un buen agente para la eliminación de colesterol. Según diferentes estudios la MBCD resulta ser tóxica para las células en períodos de incubación superiores a 12 horas (11). Por eso, en este trabajo no se emplearon incubaciones superiores a 2 horas, para evitar que el daño celular sea grande.

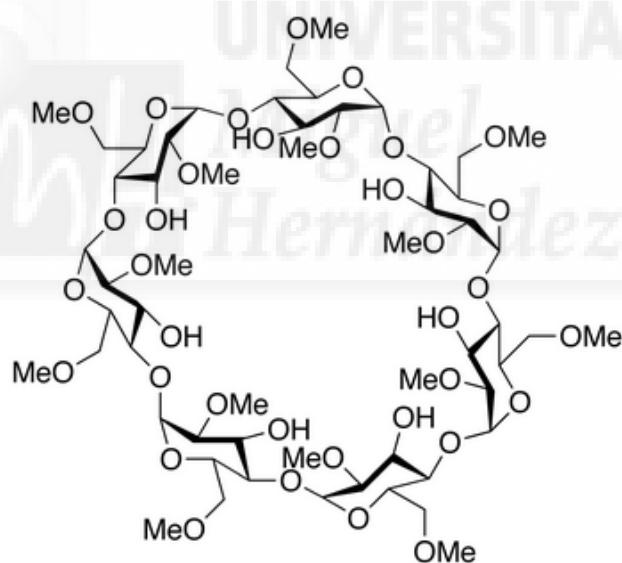


Figura 5. Estructura molecular de la metil-beta-ciclodextrina (MBCD)

Se realizó un ensayo de viabilidad celular (MTT) para determinar la citotoxicidad de la MBCD a distintas concentraciones crecientes durante 2 horas, en células EPC. En la **figura 6** se muestran los resultados de este ensayo: No se observó una disminución hasta concentraciones de 7mM. Por otro lado, la viabilidad celular empieza a descender a partir de 10mM observando un mínimo en 20mM. Las concentraciones de 0,5mM a 7mM no

presentan toxicidad celular ya que la viabilidad celular no varía mucho con respecto al control sin tratar.

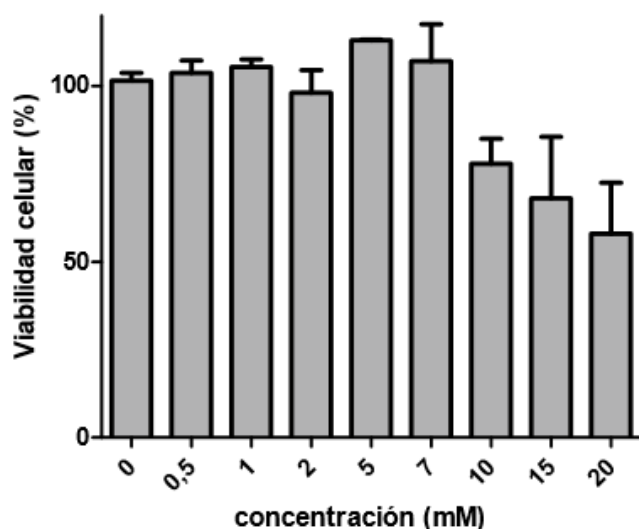


Figura 6. Ensayo de citotoxicidad de la MBCD en la línea celular EPC. Las células EPC fueron incubadas durante 2 h y a 22°C con concentraciones crecientes de MBCD. Tras la adición del reactivo MTT, la absorbancia se midió a 570 nm y se determinó el porcentaje de viabilidad considerando como control las células no tratadas (100% viabilidad celular). El ensayo se realizó por duplicado y se representan las medias con sus respectivas desviaciones estándar.

2. Efecto directo de la MBCD sobre SVCV

Teniendo en cuenta que la cápsida de SVCV está rodeada por su propia envoltura lipídica se determinó si la MBCD tenía efecto directo sobre el virus. Para investigar esta posibilidad el virus fue incubado con la MBCD durante 2h a 22°C. Tras la incubación, las células EPC fueron tratadas con esa mezcla a la misma temperatura. Tras dejarlo actuar durante 90 minutos, el virus fue retirado y las monocapas se cubrieron con metil-celulosa y se dejaron incubar durante 5 días. Pasado este tiempo los pocillos se tiñeron con cristal violeta para el recuento de calvas por pocillo, obteniéndose los resultados que se muestran en la **figura 7**.

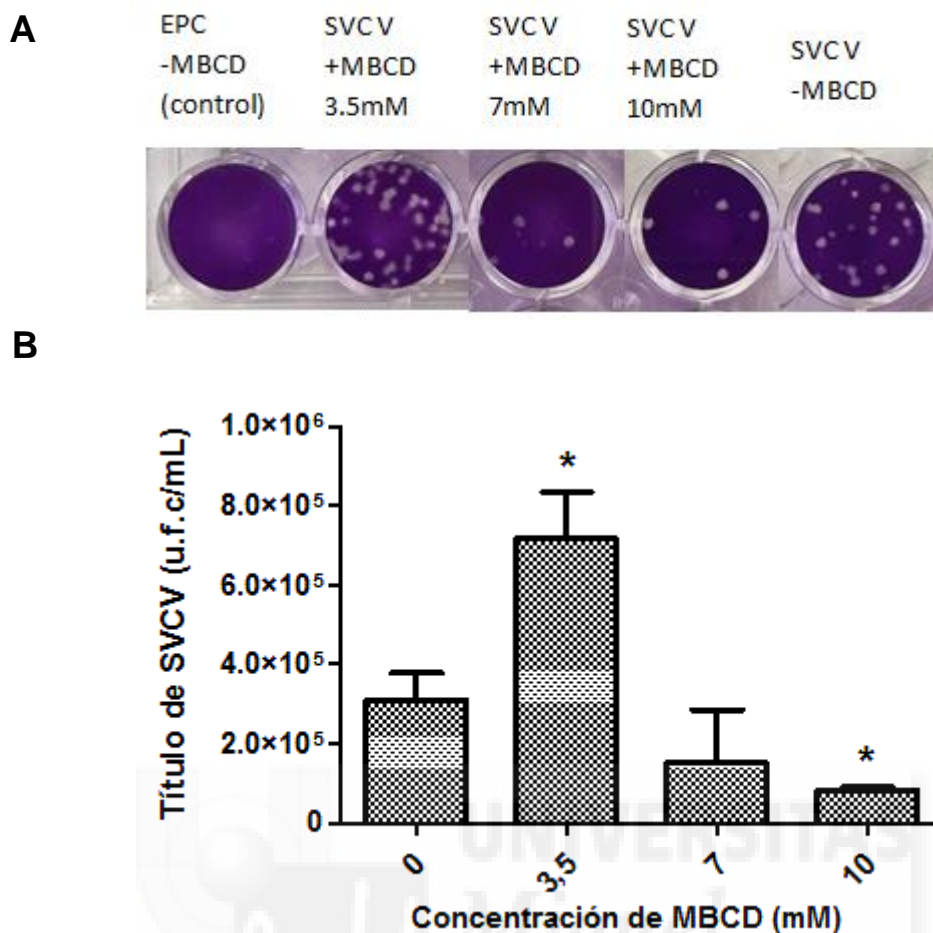


Figura 7. Efecto directo de MBCD sobre el SVCV. El virus fue incubado con la MBCD durante 2h a 22°C. Tras la incubación, las células EPC fueron infectadas con esa mezcla a 22°C. A los 90 min, el virus fue retirado y las monocapas se cubrieron con metil celulosa. A 5 días post infección los pocillos se tiñeron con cristal violeta para el recuento de calvas por pocillo. **A) Imagen de la placa teñida con cristal violeta donde se observan las calvas que produce SVCV en la monocapa celular.** **B) Título de SVCV (u.f.c/ml) tras la exposición de SVCV a concentraciones crecientes de MBCD.** El ensayo se realizó por duplicado y se representan las medias con sus respectivas desviaciones estándar. Para ver si las diferencias observadas entre el control y el tratamiento eran significativas se utilizó el test de Student.

Los resultados mostraron un comportamiento doble de la MBCD ya que se produce un incremento del título del virus con respecto al control infectado a 3,5mM tras la exposición a SVCV, de 3.1×10^5 a 7.2×10^5 u.f.c/ml. Por el contrario, a concentraciones de MBCD de 7mM y 10mM se produce un descenso en el título del virus. A 10mM de MBCD, la disminución del número de calvas es estadísticamente significativa.

3. Efecto del pretratamiento de las células EPC con MBCD en la infección con SVCV

Como SVCV forma calvas de lisis muy eficientemente en monocapas celulares se procedió a realizar el ensayo de actividad antiviral por reducción de calvas. Para ello, se partió de una placa de 24 pocillos sembrada con células EPC confluyente y se pretató con MBCD durante 2h para posteriormente ser infectado con el virus SVCV a una multiplicidad de 10^{-4} virus/célula. Esta placa se incubó durante 90 minutos a 22°C , para determinar que el virus se internalice en las células. Pasado este tiempo se retiró el medio y se añadió metil-celulosa. A los 5 días post infección se paró la infección y se tiñó la placa con cristal violeta.

Los resultados se muestran en la **figura 8**: Se observa que hay mayor número de calvas en las concentraciones de 1,5mM y 3,5mM. A 7mM se observa un pequeño aumento del 9% con respecto al control infectado. A 10mM de MBCD se obtuvo un descenso de $3,3 \times 10^5$ a 2×10^5 u.f.c/ml, pero no es estadísticamente significativo.

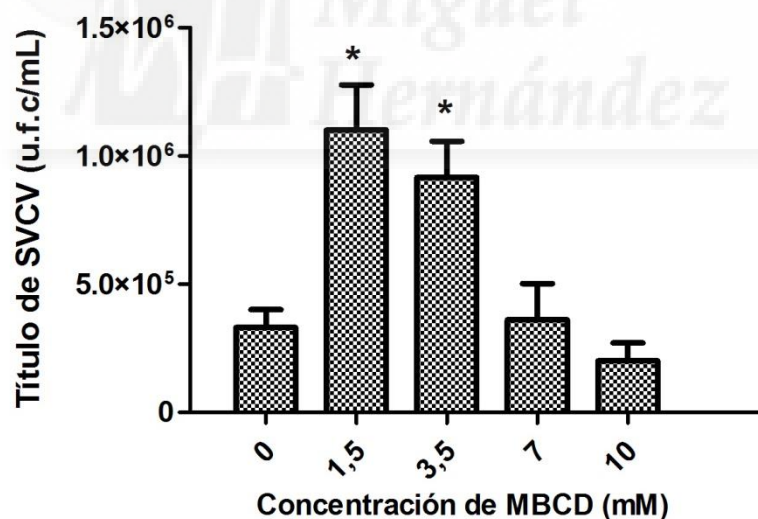


Figura 8. Título de SVCV (u.f.c/ml) en células EPC pretratadas con MBCD 2h antes de la infección con SVCV. Las células EPC fueron incubadas con MBCD a concentraciones crecientes durante 2h y posteriormente infectadas con SVCV a $\text{MOI} = 10^{-4}$. 90 min después de la infección, el virus fue retirado y las monocapas se cubrieron con metil celulosa. A los 5 días post infección los pocillos se tiñeron con cristal violeta para el recuento de calvas por pocillo. El ensayo se realizó por duplicado y se representan las medias con sus respectivas desviaciones estándar. Para ver si las diferencias observadas entre el control y el tratamiento eran significativas se utilizó el test de Student.

Los datos de infectividad se contrastaron mediante experimentos de inmunofluorescencia indirecta que se utiliza para determinar la replicación de SVCV en las células, permitiendo visualizar focos de infección del virus en la monocapa. Las células pretatadas con MBCD se infectaron con SVCV y se utilizó un anticuerpo producido en conejo AF-488 para cuantificar la infección. A las 24 horas se observó una reducción del 62 % de infectividad del SVCV en 7mM de MBCD respecto del control; esta inhibición aumento un 6 % en 10mM respecto al control. En la **Figura 9** se muestran fotografías de un experimento representativo y los resultados de células EPC tratadas con MBCD. En este caso si se observó un descenso del título de SVCV en células pretratadas con MBCD a 7mM significativo, mientras que no hubo cambios significativos a 10mM.

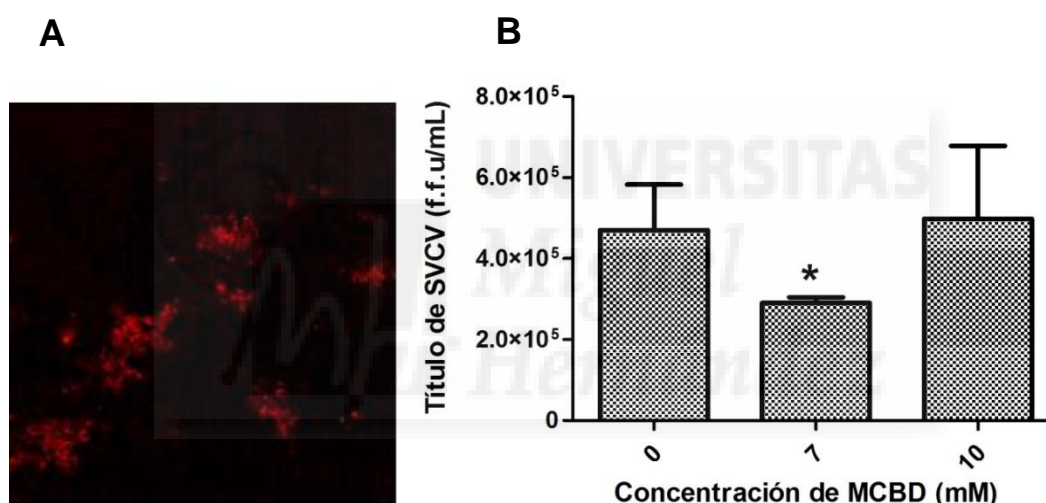


Figura 9. Efecto de MBCD sobre la formación de focos de infección de SVCV. Las células EPC fueron incubadas con MBCD a concentraciones crecientes durante 2h y posteriormente infectadas a 22°C con SVCV a MOI= 10⁻⁴ durante 90 minutos. Pasadas 24 horas las monocapas se fijaron con formalina 4% y a continuación se realizó una inmunofluorescencia. **A) Imagen de focos de infección de SVCV sobre EPC a las 24 horas post-infección B) Título de SVCV (f.f.u./ml) en células EPC pretratadas con MBCD 2h antes de la infección con SVCV.** El título de SVCV se determinó mediante el recuento de focos fluorescentes. El ensayo se realizó por duplicado y se representan las medias con sus respectivas desviaciones estándar. Para ver si las diferencias observadas entre el control y el tratamiento eran significativas se utilizó el test de Student.

4. Síntesis de RNA y proteínas de SVCV en células tratadas con MBCD

Una forma de evaluar la replicación de un virus es mediante la cuantificación de RNA viral en las células infectadas mediante RT-qPCR. La expresión génica, tras el pretatamiento de 2h con MBCD, se determinó posteriormente de incubar durante 90 minutos las células EPC con el virus SVCV a una multiplicidad de 10^{-2} y 10^{-3} virus/célula. En la **figura 10** se muestran los resultados de la determinación de los niveles de expresión del gen N-SVCV. Como se observa en el gráfico (**Figura 10**), a concentraciones de 3,5mM de MBCD las células infectadas con SVCV es un orden de magnitud superior a las otras concentraciones. Por otro lado, y como se esperaba, se observa que sube a 3,5mM y baja a 7mM, y que es independiente de MOI.

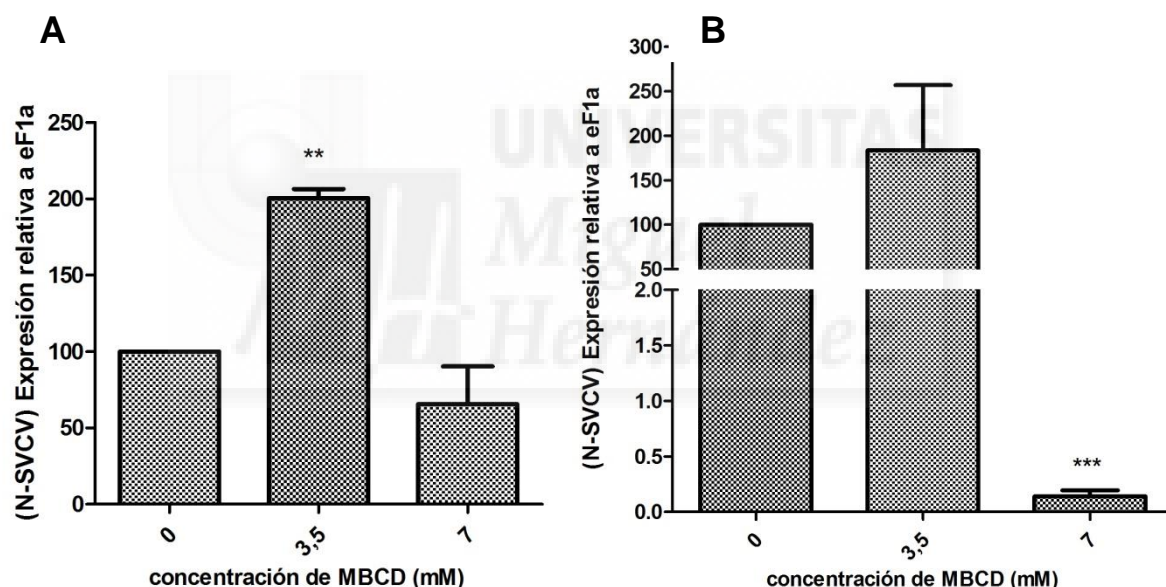


Figura 10. Expresión de N-SVCV medida mediante RT-qPCR en células EPC tratadas MBCD e infectadas con SVCV. Las células EPC fueron incubadas con MBCD durante 2h y posteriormente infectadas a 22°C con SVCV durante 90 minutos. Pasadas 24 horas se realizó una RT-qPCR. El porcentaje de expresión génica relativa a eF1a viene determinado por la siguiente fórmula: (expresión N-SVCV relativa a eF1a en células tratadas con MBCD e infectadas con SVCV / expresión N-SVCV relativa a eF1a en células sin tratar e infectadas con SVCV)*100. **A) Porcentaje de expresión génica de N-SVCV en células infectadas con MOI= 10⁻².** **B) Porcentaje de expresión génica de N-SVCV en células infectadas con MOI= 10⁻³.** Cada uno de los experimentos se realizó por duplicado. Los resultados representan las medias y sus correspondientes desviaciones estándar. Para determinar si las diferencias observadas entre el control y el tratamiento eran significativas se utilizó el test de Student.

Otra forma de evaluar la replicación de un virus en unas células es medir la producción de proteína viral mediante citometría de flujo, debido a que las células infectadas expresan una proteína viral en su superficie que puede ser detectada con un anticuerpo anti SVCV. Mediante esta técnica pudimos observar que el porcentaje de infección de SVCV descendía a 24% en células tratadas con 7mM de MBCD, los resultados se muestran en la **figura 11**, confirmando los resultados de la cuantificación de RNA.

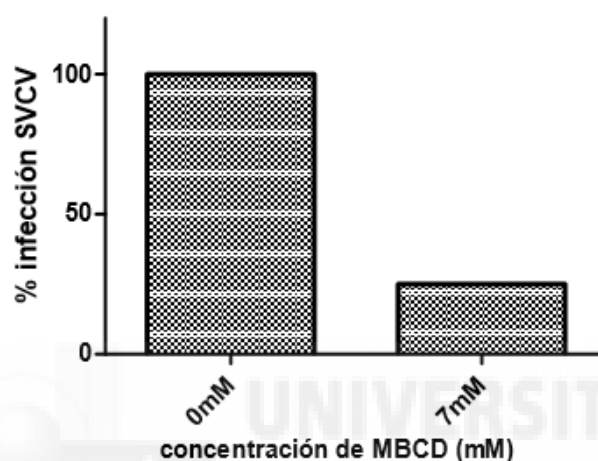


Figura 11. Porcentaje de infección de SVCV. Las células EPC fueron incubadas con MBCD (7 mM) durante 2h. Posteriormente, las monocapas fueron infectadas con SVCV a $MOI= 10^{-3}$. Tras la realización de una inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo anti SVCV, la placa de 96 pocillos con las células en suspensión se introdujo en un citómetro de flujo BD FACSCanto II (BectonDickinson) para analizar los resultados. El porcentaje de infección de SVCV se determinó comparándolo con el control infectado sin tratar (100% infección).

5. Efecto del pretratamiento con MBCD en la infección con VHSV

VHSV es otro Rhabdovirus de pez que debería tener unos requerimientos de entrada similares al SVCV. De hecho, aunque VHSV es un virus de salmónidos, es capaz de entrar y replicar eficientemente en células EPC a 14°C.

Se sembró una placa de 96 pocillos con células EPC pretatadas con MBCD durante 2h a 22°C y se infectó con VHSV (moi: 0,001 virus/pocillo) siguiendo el protocolo estándar de infección. Los resultados están recogidos en la **figura 12**. El porcentaje de supervivencia celular se determinó comparándolo con el control no infectado (100% supervivencia). Se observó

un descenso de la supervivencia celular en 1,5mM del 13,56% al 7,79% y al 5,7% a una concentración de 3,5mM. En 7mM la supervivencia descendió un poco con respecto al control sin tratar, pero no fue un descenso tan marcado como en el caso de 3,5mM. En definitiva, no se observó un incremento de la supervivencia celular en ninguna de las concentraciones, lo que sugiere que la MBCD no tiene efecto inhibitorio sobre la entrada de VHSV.

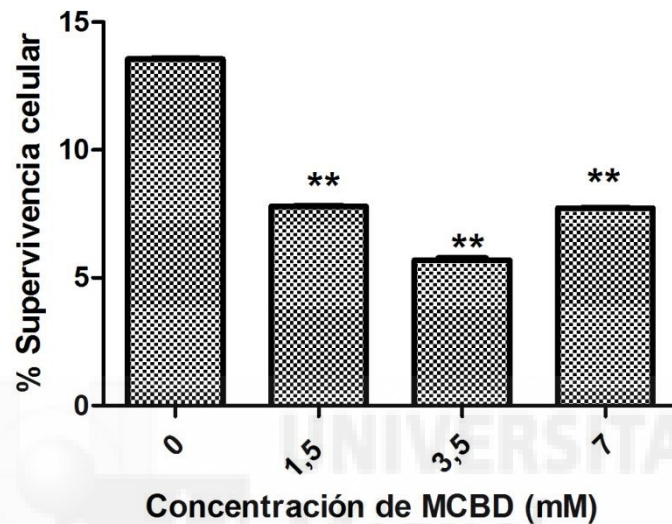


Figura 12. Porcentaje de supervivencia celular en células EPC pretratadas con MBCD 2h antes de la infección con VHSV. Las células EPC fueron incubadas con MBCD a concentraciones crecientes (0; 1,5; 3,5; 7 mM) durante 2h y posteriormente infectadas con VHSV a $MOI= 10^{-2}$ a $14^{\circ}C$. 6 días después de la infección, el virus fue retirado y las monocapas se fijaron con metanol y fueron teñidas con Giemsa para medir la densidad óptica a 570nm. El ensayo se realizó por duplicado y se representan las medias con sus respectivas desviaciones estándar. Para ver si las diferencias observadas entre el control y el tratamiento eran significativas se utilizó el test de Student.

DISCUSIÓN

1. Estudio del papel de las balsas lipídicas en la de entrada de SVCV en la célula hospedadora

En el presente trabajo se investigó el papel de los lipid rafts en la entrada de Rhabdovirus de peces a la célula, es decir, en el primer paso del ciclo de replicación del virus, y concretamente la fusión entre la membrana vírica y la membrana de la célula hospedadora. La mayoría de las familias de virus, y en concreto los Rhabdovirus como el SVCV, utilizan la endocitosis mediada por receptor como principal medio de entrada en la célula. En trabajos anteriores se demuestra la implicación de los lipid rafts en la infección de las células por parte de virus (12). En este trabajo se quiso demostrar que, tal como se pensaba, las balsas lipídicas desempeñan un papel importante en los pasos tempranos del ciclo replicación de un Rhabdovirus de pez. Para ello se plantearon una serie de experimentos mediante pretatamiento con MBCD y posterior infección con SVCV.

El compuesto MBCD es un agente que secuestra colesterol de la membrana celular, de modo que desorganiza las balsas lipídicas (13). Nosotros no hemos determinado cuanto colesterol retira la MBCD de la membrana, pero podemos basarnos en lo que han publicado otros autores (1) a concentraciones parecidas (0,5-10 mM). Los niveles de colesterol disminuyeron de una manera dependiente de la dosis. El tratamiento con MBCD 0,5 mM disminuyó el nivel de colesterol en más del 40%. A una concentración de 5 mM de MBCD se eliminó aproximadamente el 90% de colesterol de las células. Estos resultados mostraron que altas concentraciones de MBCD pueden eliminar eficientemente el colesterol de las células.

Los resultados aquí mostrados indican que la infección con SVCV en células EPC depende de la concentración de MBCD que secuestra selectivamente colesterol de las membranas de las células diana, ya que observamos un aumento significativo del título del virus a 3,5mM de MBCD y por el contrario, un descenso a 7mM, lo que denominamos efecto “doble” de

la MBCD. En el trabajo de Hotta et al., 2009, se demostró que el agotamiento del colesterol tras tratamiento con MBCD causaba un aumento en la infectividad del virus de la rabia, que también es un rhabdovirus. Se ha demostrado que este agente químico eficaz no se incorpora en las membranas tratadas y en cultivo celular incrementa la infectividad de la rabia (5-10mM), demostrando así el comportamiento doble de la MBCD. Este mismo resultado puede ser observado cuando las células se tratan con nistatina (antibiótico que se une a esteroides e inhibe la endocitosis dependiente de caveolas al eliminar el colesterol de la membrana) (14). Estos resultados sugieren que el tratamiento con MBCD mejora la unión del virus de la rabia a las células. No obstante, el efecto del tratamiento puede ser revertido con la adición de colesterol (1).

Es más frecuente que la MBCD tenga un efecto inhibitorio sobre la infección de un virus. Se ha descrito, por ejemplo (15) (16), que la MBCD además de inhibir la endocitosis mediada por clatrina y caveolas, tiene un efecto negativo sobre la unión de otros virus, como el Virus de la enfermedad de Newcastle, con las células diana (85 % de inhibición a una concentración de 10 mM), concluyendo que la presencia de colesterol en la membrana celular es importante en los procesos como la interacción virus-célula que se dan en la entrada vírica.

En este trabajo se investigó el efecto directo, o “virucida” de MBCD sobre la partícula viral de SVCV, mostrando un comportamiento doble de la MBCD ya que primero se produce un aumento del título del virus con respecto al control a 3,5mM estimulando la infectividad de SVCV mientras que a 7mM y 10mM desciende el título del virus. En el trabajo de Wang et al., 2009, se analizó el efecto “virucida” del tratamiento con MBCD (0,5 – 10mM) sobre el virus de la estomatitis vesicular (VSV), que es el virus tipo de la familia rhabdoviridae, mostrando una alteración de la producción de virus de una manera dependiente de la dosis: a 5mM disminuyó la producción de virus en más del 60% y a 10mM se inhibe un 80%. Este efecto se podía revertir añadiendo colesterol.

Para explorar la función de las balsas lipídicas durante el ciclo de vida de VSV, varios estudios observaron que el agotamiento del colesterol de las células mediante el tratamiento del MBCD, resultaba en una inhibición significativa de la producción de virus. Como resultado, la estabilidad de la interacción del colesterol - esfingomielina en las membranas se destruye y la integridad de la estructura de la balsa lipídica se ve perturbada de manera dramática. Estos resultados apoyan fuertemente una función importante de las balsas lipídicas durante el ciclo de vida del VSV (1). Para investigar si las balsas lipídicas desempeñan un papel en los pasos de replicación, estudios previos trataron las células con concentraciones crecientes de MBCD después de la infección con VSV durante 1h observando un efecto leve, pero dependiente de la dosis. Al aumentar las concentraciones de MBCD, la producción de VSV disminuyó. Estos resultados indican que la reducción de la producción de virus se debió específicamente al agotamiento del colesterol de las células hospedadoras, aunque como ya hemos dicho, el efecto de MBCD es: La producción de VSV se restauró a más del 85% mediante la adición de 100 μ M de colesterol.

En nuestro caso (SVCV), los resultados del pretatamiento con MBCD a 7mM no fueron concluyentes puesto que no se observaron diferencias significativas en la formación de focos de infección con SVCV y en la actividad antiviral por reducción de calvas. En la formación de focos se produce un descenso del 61% del título de SVCV con respecto al control infectado. Sin embargo, en el recuento de calvas se observa un aumento del 9% con respecto al control. Una posible explicación a esta discrepancia puede estar en la diferencia de tiempo post-infección, ya que en la formación de focos se analizaron los resultados tras 24 horas de incubación, mientras que para lograr la formación de calvas transcurren 5 días. Hay que tener en cuenta que la célula va reponiendo colesterol en la membrana (17).

2. Efecto “doble” de la MBCD

El posible efecto, tanto estimulador como inhibidor que produce la MBCD es algo que ya se había empezado a observar en distintos trabajos (17) (1). En otros sistemas virus/célula se ha demostrado que la MBCD puede tanto incrementar como inhibir la infectividad de distintos virus. Pero en estos estudios no se han encontrado otros sistemas virus/célula con este efecto doble de MBCD sobre el mismo virus, por lo que el caso de MBCD / SVCV, de confirmarse, sería totalmente nuevo. Es posible que una retirada limitada de colesterol favorezca la entrada de SVCV, mientras que una retirada mayor de colesterol y destrucción de los lipid rafts afecta significativamente la entrada de SVCV.

Podría tratarse de un efecto también de MBCD en el proceso de salida del virus, tal y como se ha descrito en el caso del virus de la gripe (9). El efecto durante la salida del virus no parece ser nuestro caso ya que, en nuestro caso la MBCD se retira del medio horas antes de que suceda la salida de SVCV de las células. Es posible que a baja concentración de MBCD perturbe la membrana celular, facilitando la entrada del virus, mientras que MBCD a más alta concentración desorganiza los lipid rafts inhibiendo la entrada del virus. Para comprobar este punto deberíamos cuantificar el porcentaje de colesterol en las membranas de células EPC, tratadas con MBCD como han hecho otros autores (1). No existen trabajos previos en los que se haya visto este efecto doble de la MBCD, por lo que éste es un campo que está por explorar.

En todo caso, pensamos que este efecto doble de MBCD sobre SVCV es real, ya que se observa utilizando distintas técnicas de cuantificación de la replicación del virus: MTT, calvas, focos, qPCR.

3. Comparación del efecto de MBCD sobre SVCV y sobre otro Rhabdovirus de pez: VHSV

El virus SVCV afecta principalmente a la carpa común *Cyprinus carpio* y a otros ciprínidos. La enfermedad se produce, fundamentalmente, en primavera y cuando la temperatura del agua está por debajo de los 18°C. Por el contrario, VHSV afecta tanto a los salmónidos de agua dulce como a los de agua salada. La enfermedad se reproduce a temperaturas por debajo de los 14°C.

A modo de explicación, podemos decir que la membrana de las células no tiene por qué estar igual: A 22°C (SVCV) y que a 14°C (VHSV). De hecho, no parece haber efecto inhibitorio de MBCD para VHSV. No hay indicios para pensar que el mecanismo de entrada de SVCV y VHSV sea diferente. En principio MBCD debería afectar de igual manera a SVCV y VHSV, pero según nuestros resultados preliminares no es el caso. También es posible que la entrada de VHSV siga un mecanismo de endocitosis mediada por clatrina, tal y como se ha sugerido para el virus de la necrosis hematopoyética de salmónidos (18).

Para finalizar, decir que los resultados descritos en este trabajo podrían ser utilizados para la obtención de nuevas dianas terapéuticas, así como nuevas estrategias de prevención de enfermedades víricas. En particular el conocimiento del mecanismo de funcionamiento de los lipid rafts resulta fundamental debido a la implicación de estos en el primer paso de la infección de las células por parte de virus (12).

CONCLUSIONES

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

1. Se ha profundizado en la caracterización de la acción de MBCD (un agente que retira colesterol de las membranas celulares y perturba la integridad de las balsas lipídicas) en células de pez, donde es capaz de reducir la infectividad del virus SVCV.
2. Se ha demostrado que el efecto de MBCD parece ser tanto sobre la partícula viral (virucida) como sobre la membrana celular (pretatamiento).
3. Se ha encontrado de forma inesperada un efecto doble de MBCD, ya que a bajas concentraciones no inhibe, sino que estimula la infectividad de SVCV.
4. Se ha constatado que la MBCD no parece tener efecto inhibitorio sobre otros Rhabdovirus de pez (VHSV), lo que sugiere una influencia de la temperatura en la acción de MBCD sobre la membrana celular.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Wang W, Fu YJ, Zu YG, Wu N, Reichling J, and Efferth T.** 2009. *Lipid rafts play an important role in the vesicular stomatitis virus life cycle.* Arch Virol. 154(4): 595-600. (W. Wang et al., 2009)
2. **Ashraf U, Lu Y, Lin L, Yuan J, Wang M, and Liu X.** 2016. *Spring viraemia of carp virus: recent advances.* J Gen Virol. 97(5): 1037-51.
3. **Purcell, M. K., K. J. Laing, and J. R. Winton.** 2012. *Immunity to fish rhabdoviruses.* Viruses 4:140-166
4. **Pike L.** 2003. *Lipid rafts: bringing Order to Chaos.* Journal of Lipid Research 44(4):655-67
5. **Zhang F, Guo H, Zhang J, Chen Q, Fang Q.** 2017. Identification of the caveolae/raft-mediated endocytosis as the primary entry pathway for aquareovirus. Virology 513:195-207
6. **Poh, M. K., A. Yip, M. Zhang, J. P. Priestle, N. L. Ma, J. M. Smit, J. Wilschut, P.-Y. Shi, M. R. Wenk, and W. Schul.** 2009. A small molecule fusion inhibitor of dengue virus. Antiviral Res. 84:260-266
7. **Estepa, A., A. Rocha, V. Mas, L. Perez, J. A. Encinar, E. Nuñez, A. Fernandez, J. M. Gonzalez-Ros, F. Gavilanes, and J. M. Coll.** 2001. *A protein G fragment from the salmonid viral hemorrhagic septicemia rhabdovirus induces cell-to-cell fusion and membrane phosphatidylserine translocation at low pH.* J. Biol. Chem. 276:46268-46275

8. **Mas, V., L. Perez, J. A. Encinar, M. T. Pastor, A. Rocha, E. Perez-Paya, A. Ferrer-Montiel, J. M. Gonzalez Ros, A. Estepa, and J. M. Coll.** 2002. *Salmonid viral haemorrhagic septicaemia virus: fusion-related enhancement of virus infectivity by peptides derived from viral glycoprotein G or a combinatorial library.* J. Gen. Virol. **83**:2671-2681
9. **Barman, S., Debi P. and Nayak.** 2007. *Lipid Raft Disruption by Cholesterol Depletion Enhances Influenza A Virus Budding from MDCK Cell.* J Virol. 81(22): 12169–12178.
10. **David R. M. Graham, Elena Chertova, Joanne M. Hilburn, Larry O. Arthur, and James E. K. Hildreth.** 2003. *Cholesterol Depletion of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Simian Immunodeficiency Virus with β -Cyclodextrin Inactivates and Permeabilizes the Virions: Evidence for Virion-Associated Lipid Rafts.* J Virol. 77(15): 8237–8248.
11. **Huang, R., G. Zhu, J. Zhang, Y. Lai, Y. Xu, J. He, and J. Xie.** 2017. *Betanodavirus-like particles enter host cells via clathrin-mediated endocytosis in a cholesterol-, pH- and cytoskeleton-dependent manner.* Vet Res. **48**: doi: 10.1186/s13567-017-0412-y.
12. **Pelkmans, L. and Helenius, A.** 2003. *Insider information: what viruses tell us about endocytosis.* Curr.Opin.Cell Biol. 15:414-422
13. **Stuart, A. D., Eustace, H. E., McKee, T. A., and Brown, T. D.** 2002. *A novel cell entry pathway for a DAF-using human enterovirus is dependent on lipid rafts.* J.Virol. 76, 9307-9322.
14. **Hotta K., B. Bazartseren, Y. Kaku, A. Noguchi, A. Okutani, S. Inoue, and A. Yamada.** 2009. *Effect of cellular cholesterol depletion on rabies virus infection.* Virus Res. **139**: 85-90.

15. **Cantin, C., Holguera, J., Ferreira, L., Villar, E., and Munoz-Barroso, I.** 2007. *Newcastle disease virus may enter cells by caveolae-mediated endocytosis.* J.Gen.Virol. 88:559-569.
16. **Martin, J. J., Holguera, J., Sanchez-Felipe, L., Villar, E., and Munoz-Barroso, I.** 2012. *Cholesterol dependence of Newcastle Disease Virus entry.* Biochim.Biophys.Acta **1818**:753-761.
17. **Brogden, G., M. Adamek, M. J. Proepsting, R. Ulrich, H. Y. Naim, and D. Steinhagen.** 2015. *Cholesterol-rich lipid rafts play an important role in the Cyprinid herpesvirus 3 replication cycle.* Vet Microbiol. **179**:204-212.
18. **Liu, H., Y. Liu, S. Liu, DW. Pang, and G. Xiao.** 2011. *Clathrin-Mediated Endocytosis in Living Host Cells Visualized through Quantum Dot Labeling of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus.* J. Virol. **85**:6252-6262

