



## TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA



**UNIVERSITAS**  
*Miguel Hernández*

### EVALUACIÓN DE EXTRACTOS DE DOS ESPECIES DE MICROALGAS COMO INHIBIDORES DE VIRUS DE CARPA Y DE SALMÓN

**AUTORA:** Lucía Calpe Joli

**TUTOR:** Luis Pérez García-Estañ

**Curso académico:** 2025/2026

## RESUMEN

Las enfermedades víricas representan uno de los principales desafíos para la acuicultura debido a las importantes pérdidas económicas que ocasionan y a la escasez de tratamientos antivirales eficaces. Entre las más relevantes se encuentran las causadas por algunos miembros de la familia *Rhabdoviridae*, como el virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV) o el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV). En este contexto, las microalgas representan una fuente prometedora de compuestos bioactivos con potencial antiviral.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antiviral de extractos acuosos y metanólicos de especies de microalgas verdes, con especial atención a *Chlamydomonas reinhardtii* y *Dunaliella salina*, frente a SVCV y a IHNV. Para ello, se realizaron ensayos de viabilidad celular, cuantificación de ARN viral y ensayos por pretratamiento y durante la entrada del virus a la célula. Además, se evaluó la actividad combinada de ambas microalgas, y finalmente se estudió la duración del efecto de protección antiviral en las células tratadas con los extractos.

Los resultados mostraron que los extractos metanólicos presentaron una actividad antiviral superior a la de los extractos acuosos. Tanto el preparado a partir de *Chlamydomonas reinhardtii*, como el de *Dunaliella salina*, protegieron eficazmente a las células frente a la infección por SVCV e IHNV, reduciendo el efecto citopático y, en otros ensayos, la síntesis de RNA viral y la producción de nuevos virus. Se observó que los extractos pueden interferir en etapas tempranas de la infección y que ambos mantuvieron una actividad protectora prolongada frente a SVCV. La combinación de extractos mostró una elevada eficacia antiviral en varios de los ensayos realizados.

En conjunto, este trabajo respalda el potencial de los extractos metanólicos de microalgas como una alternativa prometedora para el desarrollo de nuevas estrategias de prevención y control de enfermedades víricas en acuicultura.

**Palabras clave:** Acuicultura; microalgas; actividad antiviral; *Chlamydomonas reinhardtii*; *Dunaliella salina*; SVCV; IHNV.

## SUMMARY

Viral diseases represent one of the major challenges facing aquaculture due to the significant economic losses they cause and the limited availability of effective antiviral treatments. These diseases are mainly caused by members of the family *Rhabdoviridae*, such as Spring Viremia of Carp Virus (SVCV) and Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV). In this context, microalgae have emerged as a promising source of bioactive compounds with antiviral potential.

The aim of this study was to evaluate the antiviral activity of aqueous and methanolic extracts from the green microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Dunaliella salina*, against SVCV and IHNV. To this end, cell viability assays, viral RNA quantification and antiviral assays involving both cell pretreatment and viral entry were performed. In addition, the antiviral activity of combined extracts of both microalgae and the duration of the protective effect were evaluated.

The results showed that methanolic extracts exhibited greater antiviral activity than the aqueous extracts. Both *Chlamydomonas reinhardtii* and *Dunaliella salina* effectively protected cells against SVCV and IHNV infection by reducing the cytopathic effect inhibiting viral RNA synthesis and viral production of new virus particles. Furthermore, the extracts were able to interfere with the early stages of viral infection, and both maintained a prolonged protective effect against SVCV. The combination of extracts also showed high antiviral efficacy in several of the assays performed.

Overall, our findings support the potential of methanolic microalgal extracts as promising alternatives for the development of new strategies for the prevention and control of viral diseases in aquaculture.

**Keywords:** Aquaculture; microalgae; antiviral activity; *Chlamydomonas reinhardtii*; *Dunaliella salina*; SVCV; IHNV.

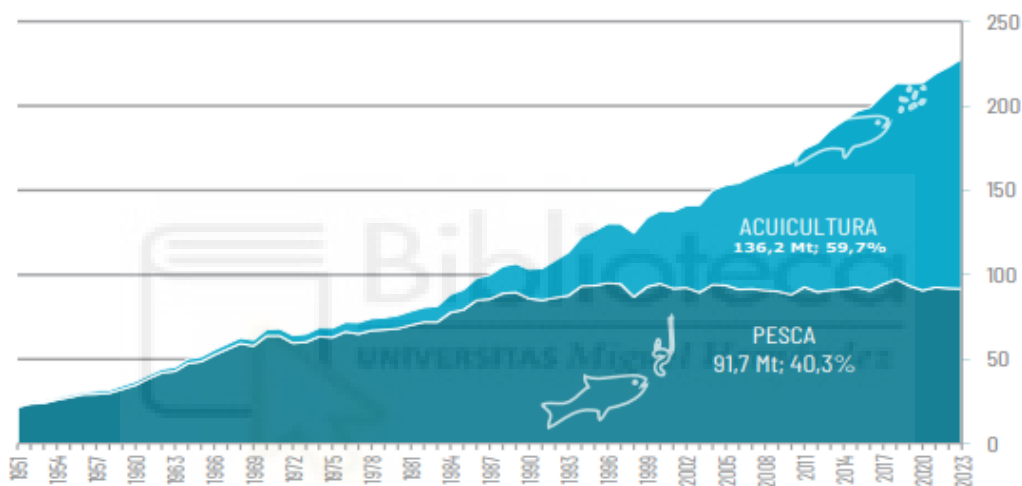
## Índice

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introducción .....                                                                  | 4  |
| 1.1. La Acuicultura .....                                                              | 4  |
| 1.2. Enfermedades víricas en acuicultura .....                                         | 5  |
| 1.3. Compuestos naturales como antivirales .....                                       | 7  |
| 1.4. Las microalgas <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> y <i>Dunaliella salina</i> .....  | 9  |
| 2. Antecedentes .....                                                                  | 11 |
| 3. Objetivos .....                                                                     | 12 |
| 4. Materiales y métodos .....                                                          | 13 |
| 4.1. Algas utilizadas en este trabajo.....                                             | 13 |
| 4.2. Línea celular EPC y CHSE.....                                                     | 13 |
| 4.3. Virus SVCV e IHNV .....                                                           | 13 |
| 4.4. Preparación de extractos .....                                                    | 13 |
| 4.4.1. Preparación de extractos en metanol- agua (80:20) .....                         | 13 |
| 4.4.2. Preparación de extractos en agua .....                                          | 14 |
| 4.5. Preparación de tinciones .....                                                    | 14 |
| 4.6. Ensayos de actividad antiviral.....                                               | 14 |
| 4.6.1. Ensayo de actividad antiviral durante la entrada del virus .....                | 14 |
| 4.6.2. Ensayo de actividad antiviral por pretratamiento con los extractos .....        | 15 |
| 4.7. Ensayo TCID <sub>50</sub> .....                                                   | 15 |
| 4.8. Captura de imágenes en microscopio óptico .....                                   | 16 |
| 4.9. Análisis estadístico .....                                                        | 16 |
| 4.10. Análisis de la expresión de genes por qPCR .....                                 | 16 |
| 5. Resultados .....                                                                    | 18 |
| 5.1. Toxicidad del Metanol.....                                                        | 18 |
| 5.2. Efecto de extractos de <i>Chlamydomonas</i> sobre SVCV .....                      | 18 |
| 5.2.1. Pretratamiento con extracto metanólico y acuoso.....                            | 18 |
| 5.2.2. Efecto de los extractos sobre la entrada de SVCV .....                          | 20 |
| 5.2.3. Comparación entre las algas <i>Chlamydomonas</i> y <i>Dunaliella</i> .....      | 20 |
| 5.2.4. Duración de la protección .....                                                 | 21 |
| 5.3. Efecto de extractos de <i>Chlamydomonas</i> sobre IHNV.....                       | 22 |
| 5.3.1. Comparación <i>Chlamydomonas</i> , <i>Arthrospira</i> , <i>Dunaliella</i> ..... | 22 |
| 5.3.2. Pretratamiento <i>Chlamydomonas</i> y <i>Dunaliella</i> .....                   | 23 |
| 5.3.3. Efecto de <i>Chlamydomonas</i> y <i>Dunaliella</i> durante la entrada .....     | 25 |
| 6. Discusión .....                                                                     | 27 |
| 7. Conclusiones .....                                                                  | 31 |
| 8. Agradecimientos .....                                                               | 32 |
| 9. Bibliografía .....                                                                  | 33 |

# 1. Introducción

## 1.1. La Acuicultura

La acuicultura constituye uno de los sectores de producción de alimentos de mayor importancia a nivel mundial, ya que proporciona una fuente segura y fiable de proteína animal de alta calidad y contribuye significativamente a la economía de numerosos países (Wong et al., 2024). Su crecimiento ha sido impulsado por la necesidad de satisfacer la creciente demanda de productos del mar debido al aumento constante de la población mundial (MKulo et al., 2024). A diferencia de la pesca extractiva, la acuicultura permite la producción de organismos acuáticos en entornos controlados, donde los animales son monitoreados continuamente para optimizar su crecimiento y bienestar.



**Figura 1.** Evolución de la producción acuática mundial (acuicultura más pesca) en el periodo 1951-2023 (APROMAR, 2025).

Dentro de las especies cultivadas, la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) ocupa un lugar destacado debido a su rápido crecimiento, su elevada calidad nutricional y su gran aceptación en los mercados internacionales. Esta especie constituye uno de los salmónidos más importantes de la acuicultura mundial con una producción de 1.150.496 t en 2023, y es ampliamente cultivada en América del Norte, América del Sur y Asia. En Europa es la segunda especie más cultivada, con una producción de 170.246 t por valor de 693,13 M€, de ellos 4.690 M€ corresponden a España (APROMAR, 2025). Su capacidad de adaptación a distintos sistemas de producción ha favorecido su expansión y consolidación como una de las especies de agua dulce de mayor interés comercial.

Otra especie relevante de agua dulce es la carpa común (*Cyprinus carpio*), su importancia deriva de características como su elevada capacidad reproductiva, rápido crecimiento,

resistencia a diferentes condiciones ambientales y eficiencia en la conversión alimenticia. Estas ventajas han convertido a la carpa en la novena especie más cultivada del mundo con un valor de 7.829 M€, la sexta en Europa con 63.430 t (208,07 M€) y con una gran producción en Asia (APROMAR, 2025).

A pesar de su relevancia productiva, tanto la trucha como la carpa enfrentan importantes desafíos sanitarios derivados de la intensificación de los sistemas de cultivo. El aumento de las densidades de producción, la globalización del comercio de peces, la degradación ambiental y el cambio climático han favorecido a la aparición y propagación de enfermedades infecciosas que afectan gravemente a la productividad del sector. Estas enfermedades generan importantes pérdidas económicas y representan una amenaza para la sostenibilidad de la acuicultura mundial y la seguridad alimentaria (MKulo et al., 2024).

## **1.2. Enfermedades víricas en acuicultura**

Los virus constituyen algunos de los agentes infecciosos más importantes en acuicultura debido a su elevada capacidad de transmisión y al limitado número de tratamientos disponibles. Los virus son partículas microscópicas formadas por un genoma de ADN o ARN rodeado por una cápside proteica y, en algunos casos, por una envoltura lipídica derivada de la membrana de la célula hospedadora. Se consideran parásitos intracelulares obligados, ya que dependen completamente de las células vivas para replicarse y completar su ciclo biológico (Reynolds et al., 2021).

El proceso de infección viral comprende generalmente tres etapas principales: en primer lugar, el virus se une a receptores específicos presentes en la membrana celular e introduce su material genético en la célula hospedadora, posteriormente, utiliza la maquinaria celular para replicar su genoma y sintetizar proteínas virales y, finalmente, se ensamblan nuevos viriones que son liberados para infectar otras células. Su éxito evolutivo se debe a factores como su elevada variabilidad genética, la diversidad de mecanismos de transmisión, su eficiente capacidad de replicación y su habilidad para persistir en los hospedadores (Carbone et al., 2021).

Hasta la fecha, se han descrito numerosas enfermedades virales que afectan a peces de interés acuícola. Entre ellas destaca la necrosis hematopoyética infecciosa (IHN), causada por el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV), y la viremia primaveral de la carpa (SVC), causada por el virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV). Pertenecen al género

*Novirhabdovirus* y *Sprivivirus*, respectivamente, ambos pertenecientes a la familia *Rhabdoviridae* con un genoma de ARN monocatenario de sentido negativo de aproximadamente 11 kb.

El IHNV afecta principalmente a especies de salmónidos, especialmente a la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), provocando elevadas tasas de mortalidad, especialmente en estadios juveniles. Una de las características más relevantes del IHNV es su capacidad para establecer infecciones persistentes en los peces supervivientes, que pueden actuar como portadores y establecer una infección persistente.



**Figura 2.** Fotografía de dos alevines de trucha infectados por IHNV, mostrando la protrusión ocular y el oscurecimiento de la piel. Fuente: Luis Pérez, IDiBE.

Debido a su elevada contagiosidad y a las importantes pérdidas económicas que ocasiona, la necrosis hematopoyética infecciosa se considera una de las enfermedades virales más relevantes para la industria acuícola mundial.

El SVCV causa una alta mortalidad en la carpa (*Cyprinus carpio*) y otras especies de ciprínidos. Inicialmente se creía que era endémico entre la carpa común en Europa oriental y occidental, y posteriormente se informó de su presencia en América y Asia. La infección por SVCV ha surgido en muchos países europeos, y está asociada a numerosas pérdidas económicas. Estos brotes ocurren tanto en peces de cultivo como en peces silvestres, lo que sugiere la expansión del área afectada (Su & Su, 2018).



**Figura 3.** Fotografía de 2 carpas infectadas por SVCV. Fuente: Caña et al. (2020)

Los brotes de SVC suelen ocurrir en primavera, de ahí el nombre de la enfermedad. Estudios realizados en carpas han demostrado que pocos peces adultos se infectan cuando la temperatura del agua supera los 17 °C, pero los juveniles pueden infectarse incluso a 22-23 °C. La infección por SVCV es altamente letal en peces jóvenes, con una tasa de mortalidad de hasta el 90 % (Su & Su, 2018).

La infección por SVCV de la línea celular Epithelioma papulosum cyprini (EPC) puede inducir autofagia celular y apoptosis a través del estrés del retículo endoplasmático. Dado que los peces son vertebrados inferiores, la inmunidad innata es la principal línea de defensa contra las infecciones patógenas en los peces, y la autofagia celular y las reacciones de apoptosis son componentes esenciales de esta inmunidad (Jiao et al., 2023).

El medio acuático favorece la rápida transmisión de agentes virales entre los organismos cultivados (Carbone et al., 2021), por lo que el desarrollo de nuevas estrategias preventivas resulta esencial para reducir las pérdidas económicas asociadas a estas enfermedades.

### **1.3. Compuestos naturales como antivirales**

A medida que aumenta la preocupación por la calidad y la seguridad de los productos acuáticos y la contaminación ambiental, el uso de diversos fármacos químicos para prevenir enfermedades en animales de acuicultura se ha puesto cada vez más en duda (Su & Su, 2018).

La prevención y el control de las enfermedades virales constituyen uno de los principales desafíos de la acuicultura moderna, e históricamente se han basado en el uso de antibióticos y otros compuestos químicos. Sin embargo, estas estrategias presentan limitaciones importantes, ya que el uso prolongado de estos productos puede favorecer la aparición de resistencias microbianas, generar residuos en los productos acuáticos y provocar efectos adversos sobre los organismos cultivados y el medio ambiente. Además, frente a muchas enfermedades virales no

existen tratamientos terapéuticos eficaces, lo que ha impulsado el desarrollo de estrategias preventivas basadas en la bioseguridad, la inmunoprofilaxis, el uso de inmunoestimulantes y el desarrollo de vacunas cada vez más eficaces (MKulo et al., 2024).

Las vacunas representan una herramienta fundamental para el control de patologías y, aunque existe una contra IHNv (Wang et al., 2025) pero no para SVCV, su desarrollo es un proceso largo, complejo y costoso. Además, la aparición de nuevas enfermedades y la capacidad de mutación de muchos virus dificultan la obtención de soluciones universales.

Paralelamente, el incremento de la resistencia de los microorganismos a los agentes antimicrobianos disponibles y las limitaciones asociadas al uso prolongado de productos químicos han impulsado la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas más seguras y sostenibles. Por ello, en los últimos años ha aumentado el interés por la búsqueda de compuestos antivirales alternativos capaces de complementar las estrategias convencionales de control sanitario. Y, en este contexto, los compuestos naturales han emergido como una alternativa prometedora debido a su amplia disponibilidad, menor toxicidad y reducido impacto ambiental (Jassim, 2003).

Una estrategia eficaz para el desarrollo de terapias antivirales consiste en combinar compuestos que actúen sobre distintas etapas del ciclo infeccioso, con el objetivo de maximizar la eficacia del tratamiento y minimizar problemas como la baja biodisponibilidad, los efectos citotóxicos o el desarrollo de resistencia viral.

Entre las fuentes naturales más prometedoras destacan las algas y microalgas. Las algas constituyen un grupo diverso de organismos fotosintéticos, tanto micro como macroscópicos, distribuidos ampliamente en ecosistemas marinos y de agua dulce. Su rápido crecimiento, bajos requerimientos energéticos y elevada capacidad de producción de biomasa las convierten en una fuente renovable de gran interés biotecnológico. Además, aproximadamente el 9 % de los compuestos bioactivos marinos descritos hasta la fecha han sido aislados de algas, incluyendo moléculas cuya complejidad estructural dificulta o imposibilita su obtención mediante síntesis química convencional (Carbone et al., 2021).

Las microalgas poseen una enorme biodiversidad, con millones de especies potenciales adaptadas a una amplia variedad de hábitats. Esta diversidad se traduce en una extraordinaria capacidad para producir compuestos bioactivos de interés, entre los que se incluyen pigmentos, proteínas, lípidos, polisacáridos y metabolitos secundarios con propiedades farmacológicas (Fritzsche et al., 2021). Debido a estas características, las microalgas se han convertido en una

importante fuente de moléculas con potencial aplicación en los sectores farmacéutico, alimentario, cosmético y acuícola (Reynolds et al., 2021).

Entre los compuestos más estudiados destacan los polisacáridos de origen algal. Estos compuestos presentan numerosas ventajas, entre ellas una amplia disponibilidad, elevada actividad biológica, baja toxicidad y escasos efectos adversos. Diversos estudios han demostrado que los polisacáridos pueden ejercer actividad antiviral mediante la inhibición de diferentes etapas del ciclo infeccioso, incluyendo la unión del virus a la célula hospedadora, su entrada, replicación y posterior liberación. Asimismo, estos compuestos pueden potenciar las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas del hospedador, actuando como inmunoestimulantes naturales capaces de incrementar la resistencia frente a las infecciones virales (Ren et al., 2022).

Además de los polisacáridos, otros metabolitos presentes en extractos de algas, como los compuestos fenólicos y flavonoides, han mostrado efectos citoprotectores y antivirales. Se ha propuesto que estas moléculas pueden interferir con la replicación viral mediante la modulación de funciones celulares esenciales para el ciclo de infección, contribuyendo así a limitar la progresión de la enfermedad (Monteiro et al., 2021).

Como consecuencia, la investigación de compuestos naturales derivados de microalgas representa actualmente una de las líneas más prometedoras para la prevención y el control de enfermedades virales en acuicultura gracias a su potencial para actuar simultáneamente como agentes antivirales e inmunoestimulantes.

#### **1.4. Las microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* y *Dunaliella salina***

Entre las numerosas especies estudiadas, *Chlamydomonas reinhardtii* y *Dunaliella salina*, dos especies de algas verdes, destacan por sus características fisiológicas y metabólicas particulares, así como por las múltiples aplicaciones derivadas de su cultivo.

*Chlamydomonas reinhardtii* es una microalga verde unicelular perteneciente al filo *Chlorophyta*, ampliamente reconocida como organismo modelo en estudios de fotosíntesis, genética molecular y biología celular.



**Figura 4.** Foto al microscopio de *Chlamydomonas reinhardtii*. Fuente: [www.protisten.de](http://www.protisten.de)

Además de su relevancia como modelo experimental, *C. reinhardtii* ha despertado un creciente interés en el ámbito biotecnológico debido a su capacidad para producir lípidos, hidrógeno molecular, proteínas recombinantes y otros metabolitos de interés industrial. Su rápido crecimiento y la posibilidad de implementar estrategias de ingeniería metabólica la convierten en una plataforma prometedora para el desarrollo de procesos sostenibles basados en microalgas (Scaife et al., 2015; Salomé et al., 2020).

Por otro lado, *Dunaliella salina* es una microalga halófila perteneciente también al filo *Chlorophyta*, conocida por su extraordinaria capacidad para sobrevivir en ambientes hipersalinos donde pocos organismos eucariotas pueden desarrollarse. Una de sus principales características es la ausencia de una pared celular rígida, lo que le permite adaptarse rápidamente a cambios en la presión osmótica (Oren, 2005).



**Figura 5.** Foto al microscopio de *Dunaliella salina*. Fuente: Science Photo Library / Fox, Frank.

Desde el punto de vista industrial, *D. salina* es especialmente relevante debido a su capacidad para acumular elevadas concentraciones de carotenoides, principalmente  $\beta$ -caroteno, en respuesta a condiciones de estrés como alta irradiancia, limitación de nutrientes o

elevadas concentraciones de sal (Ben-Amotz y Avron, 1983; Hosseini Tafreshi y Shariati, 2009). Además, la biomasa de *D. salina* contiene otros compuestos bioactivos de interés, como proteínas, lípidos, vitaminas y antioxidantes, lo que amplía sus aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética.

A pesar de pertenecer al mismo grupo taxonómico, ambas especies presentan características biológicas y aplicaciones diferenciadas.

Debido a los hallazgos de sus propiedades antivirales frente a diversos virus en otros artículos, en este estudio se evaluará la eficacia antiviral de ambas algas, tanto por separado como en conjunto, contra la infección de IHNy y SVCV.

## 2. Antecedentes

Este trabajo se basa en los resultados obtenidos previamente en trabajos de fin de grado desarrollados en el Grupo de Estrategias Antivirales en Acuicultura (Dr. Luis Pérez, IDiBE-UMH).

En primer lugar, José Manuel Sarabia llevó a cabo un cribado de extractos de distintas microalgas disueltos en DMSO con el objetivo de identificar aquellos con actividad antiviral frente a SVCV, IHNy y VHSV. Entre las especies evaluadas, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella salina* y *Arthrospira platensis* destacaron por su capacidad para inhibir la infección viral (Sarabia, 2024).

Posteriormente, Irene Vicedo profundizó en el estudio, centrándose en el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. En este caso, comparó la actividad antiviral de extractos obtenidos en disolvente acuoso y metanólico frente a SVCV. Sus resultados demostraron que el extracto metanólico presentaba una eficacia antiviral significativamente superior a la del extracto acuoso (Vicedo, 2025).

### 3. Objetivos

El objetivo general de este TFG es evaluar la actividad antiviral de los extractos de las microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* y *Dunaliella salina* frente a los virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV) y de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV), con el fin de valorar su potencial como agentes antivirales para su aplicación en acuicultura.

Para alcanzar este objetivo se abordaron otros objetivos más específicos.

En primer lugar, comparar la actividad antiviral de los extractos acuoso y metanólico de *Chlamydomonas reinhardtii* frente a SVCV, con el propósito de determinar qué solvente permite obtener una mayor eficacia antiviral.

En segundo lugar, estudiar el mecanismo de acción de los extractos, analizando si su efecto protector se produce como consecuencia del pretratamiento de las células o mediante la inhibición de las etapas iniciales de la infección viral, fundamentalmente la entrada del virus a la célula.

En tercer lugar, comparar la actividad antiviral de diferentes microalgas, *Chlamydomonas reinhardtii* y *Dunaliella salina*, con el objetivo de identificar las especies con mayor capacidad protectora frente a ambos virus.

Y finalmente, evaluar si la combinación de extractos de *Chlamydomonas reinhardtii* y *Dunaliella salina* producía un efecto antiviral superior al obtenido con cada extracto por separado, explorando la posible existencia de efectos sinérgicos.

## 4. Materiales y métodos

### 4.1. Algas utilizadas en este trabajo

Los extractos de algas utilizados en este estudio fueron proporcionados por diferentes colaboradores. La microalga *Chlamydomonas reinhardtii* cepa UVM4 fue cedida por el Dr. M. Schroda (Universidad de Kaiserslautern, Alemania), *Arthrospira platensis* por el centro tecnológico AINIA (Valencia), y *Dunaliella salina* fue facilitada por Luis Bernabeu (Sal Coloma, Alicante). Todos los extractos fueron transformados en preparados liofilizados.

### 4.2. Línea celular EPC y CHSE

La línea celular EPC (Epithelioma Papulosum Cyprini) son células epiteliales que proceden de *Pimephales promelas*, una especie de carpa de la familia *Cyprinidae* en el orden *Cypriniformes*. Para su mantenimiento se usaron botes de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> en medio RPMI 10% a una temperatura de 21°C.

La línea celular CHSE (Chinook salmon embryo) son células embrionarias derivadas de *Oncorhynchus tshawytscha* (salmón Chinook), una especie de pez de la familia *Salmonidae* perteneciente al orden *Salmoniformes*. Para su mantenimiento se utilizaron botes de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> con medio RPMI suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (SFB), incubados a una temperatura de 21°C.

### 4.3. Virus SVCV e IHN

En este trabajo se usó el virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV) y el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHN). Las infecciones con ambos se realizaron en medio RPMI 2%, SVCV a 21°C e IHN a 14°C.

### 4.4. Preparación de extractos

#### 4.4.1. Preparación de extractos en metanol- agua (80:20)

Se pesaron 10 mg de liofilizado de algas y se añadió una mezcla de metanol agua (80:20) previamente preparada. Las soluciones se agitaron en vórtex y se sometieron a sonicación 10s. A continuación, se calentaron en bloque térmico a 60°C durante 1h, se centrifugaron a 2000rpm

durante 5 minutos y se recogieron los sobrenadantes. Estos sobrenadantes son los utilizados en los distintos experimentos.

#### **4.4.2. Preparación de extractos en agua**

Se pesaron 4 mg de liofilizado de microalgas y se añadió agua Milli-Q. La solución se agitó en vórtex y se calentó en bloque térmico a 92°C durante 2h. Posteriormente, se sometió a sonicación 10s y se centrifugó a 3000rpm durante 5 minutos, se recogieron los sobrenadantes y fueron utilizados en los experimentos.

#### **4.5. Preparación de tinciones**

La preparación de la solución de Giemsa (5 mg/ml) consiste en disolver 0,5 gramos de polvo de Giemsa en 100 ml de agua destilada, agitando bien hasta asegurar que el tinte se disuelva completamente. Una vez disuelto, se deja reposar la solución durante 24 horas, preferentemente en un recipiente oscuro. Para retirar las partículas no disueltas se filtra posteriormente la solución con un filtro fino (de 0,45  $\mu$ m). La solución resultante se debe almacenar protegida de la luz.

La preparación de la solución de tinción con cristal violeta consiste en disolver 0,1 gramos de cristal violeta en 100 ml de una solución de 10% de formaldehído en agua. Se debe agitar bien para asegurar que el cristal violeta se disuelva completamente en la solución. Una vez disuelto, se deja reposar la mezcla durante algunos minutos antes de su uso, asegurándose de que no queden partículas no disueltas. Esta solución de tinción es utilizada principalmente para la observación de células y tejidos en microscopía, proporcionando un colorante que permite visualizar estructuras celulares específicas.

#### **4.6. Ensayos de actividad antiviral**

Se realizan ensayos de supervivencia celular para determinar la actividad antiviral de los extractos de algas.

##### **4.6.1. Ensayo de actividad antiviral durante la entrada del virus**

Se realiza en placa de cultivo de 96 pocillos cuando las células presentan una confluencia del 100%. En tubos Eppendorf de 1,5ml se preparan soluciones de virus a la multiplicidad de infección de 0,02 (número de virus/célula) correspondiente en medio RPMI 2% junto con los extractos a ensayar. Seguidamente, se retira el medio de la placa, se añaden 100 $\mu$ L por pocillo de

la solución de virus con extracto y se incuba 1h a 21°C para SVCV y a 14°C para IHN. Tras la incubación se sustituye el medio con virus de la placa por medio nuevo y se deja incubar a la temperatura correspondiente para que la infección progrese. Cuando se observa que el pocillo control está suficientemente arrasado, se detiene la infección fijando con metanol y se tiñe con GIEMSA. Por último, se mide la absorbancia a 570nm en un espectrofotómetro Eon Biotek (BioTek Instruments, Inc., VT, USA).

#### **4.6.2. Ensayo de actividad antiviral por pretratamiento con los extractos**

Se realiza en placa de 96 pocillos cuando las células EPC presentan una confluencia del 100%. En tubos Eppendorf de 1,5mL se preparan disoluciones de extracto de cada una de las especies de algas en medio RPMI 2% a la concentración elegida. Entonces, se retira el medio de la placa, se añaden 100µL por pocillo de la solución de extracto y se incuba a 21°C durante 24h. Una vez transcurrido este tiempo se retira el medio con extracto de la placa y se añaden 100µL por pocillo de solución de virus (multiplicidad de infección o “multiplicity of infection” (moi) = 0,02 virus/célula) en medio RPMI 2%. Se incuba a 21°C o 14°C para que progrese la infección. Cuando se observa que en el pocillo control las células muestran un efecto citopático evidente, se detiene la infección fijando con metanol y se tiñe con Giemsa, o se añade cristal violeta directamente; el uso de uno u otro método depende del estado del control infectado. Por último, se mide la absorbancia a 570nm en un espectrofotómetro Eon Biotek (BioTek Instruments, Inc., VT, USA).

#### **4.7. Ensayo TCID<sub>50</sub>**

El título infeccioso de las muestras virales se determinó mediante el ensayo de la dosis infectiva para el 50% de los cultivos celulares (TCID<sub>50</sub>). Este método permite estimar la cantidad de virus infeccioso presente en una muestra a partir de su capacidad para producir una infección en cultivos celulares.

Después de recoger los sobrenadantes de los pocillos infectados se realizan unas diluciones seriadas en una proporción 1:10, de forma que cada dilución presentaba una concentración diez veces menor que la anterior. Se utilizaron 4 placas de 96 pocillos con células CHSE, una para cada condición a evaluar, seguido de un periodo de 12 días de incubación hasta alcanzar el efecto citopático (ECP) deseado, tras el cual se detuvo el ensayo con cristal violeta. El ECP constituye un indicador de la replicación viral y permite clasificar cada réplica como positiva o negativa para la infección.

A partir de la distribución de pocillos positivos y negativos obtenidos para las distintas diluciones, el título infeccioso se calculó como:

$$TCID_{50} = 1/10^{-\log dil > 50\% - I}$$

$$I = \left[ \frac{(\% \text{ pocillos infectados con dilución mayor } 50\% - 50\%)}{(\% \text{ pocillos infectados con dilución mayor } 50\% - \% \text{ pocillos infectados con dilución menor } 50\%)} \right]$$

$$50\% \text{ titulación} = 10^{\log \text{ dilución total mayor } 50\% - (I \times \log h)}$$

#### 4.8. Captura de imágenes en microscopio óptico

Se utilizó un microscopio Nikon Eclipse TE2000-U (Nikon instruments, inc., NY, USA) con una cámara Nikon DS-1QM acoplada para la captura de imágenes de las células.

#### 4.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa Excel, utilizando la prueba t de Student de datos independientes para calcular las diferencias de las medias de los distintos grupos experimentales. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando los P valores eran < 0,05.

#### 4.10. Análisis de la expresión de genes por qPCR

El primer paso es la extracción de ARN, en la que se recogen muestras de las células en 350µl de buffer de lisis TRK. Se utiliza el kit E.Z.N.A. Total RNA (Omega Biotek) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se cuantifica la cantidad de ARN por alícuota con un espectrofotómetro Nanodrop.

El segundo paso es la retrotranscripción del ARN (RT). Para ello se realiza una mezcla de reacción que contiene 1µl de dNTPs 10mM y 0.5µl de cebadores random hexamers por cada 11,5µl de ARN. La desnaturalización se produce a 65°C durante 5 minutos en un termociclador Applied Biosystems 2700. Después las muestras se dejan enfriar en hielo por 1 min. A cada tubo se le añade 4µl de Strand Buffer RT 5X, 2µl de DTT, 0,5µl de HP-RNase Inhibitor y 0,5µl de MMLV-RT. Finalmente, se introducen las muestras en el termociclador con el programa 25°C x 10 min, 37°C x 50 min y 70°C x 15 min.

Por último, se realiza la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), que es una técnica molecular utilizada para medir la expresión de genes mediante la amplificación y detección simultánea del ADN complementario (cDNA) derivado del ARN mensajero (ARNm). Este método combina la especificidad de la PCR convencional con una cuantificación precisa basada en la fluorescencia emitida durante la reacción. En este caso, se emplea un agente intercalante como SYBR Green, que se une al ADN de doble cadena, permitiendo monitorizar la amplificación en tiempo real.

Esta técnica mide la cantidad de un gen analizando en cuántos ciclos de amplificación se detecta una señal de fluorescencia. Este valor se llama Ct: cuanto más bajo es, mayor era la cantidad inicial de ARN del gen en la muestra. Para comparar la expresión entre diferentes genes o muestras, se usa el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , que permite calcular la expresión relativa tomando como referencia un gen estable, en nuestro caso ef1 $\alpha$ .

En este trabajo, se analizó la expresión de genes relacionados con la respuesta antiviral, incluyendo el gen N del virus SVCV en células EPC, mediante cebadores específicos (forward y reverse). La qPCR permite así evaluar cambios en la expresión de estos genes frente a diferentes tratamientos o condiciones experimentales, ofreciendo una herramienta sensible y reproducible para estudios funcionales en biología molecular.

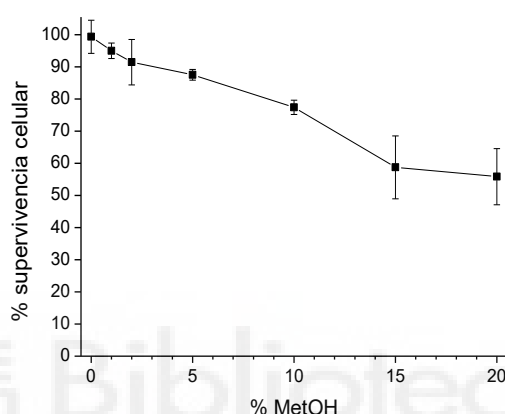
**Tabla 1.** Lista de primers

| Gen          | Primer Forward       | Primer Reverse        |
|--------------|----------------------|-----------------------|
| ef1 $\alpha$ | CTGGAGGCCAGCTCAAACAT | CATTCCCTCCTTACGCTCAAC |
| svcv-n       | GCATTATGCCGCTCCAAGAG | AGCTTGCAATTGAGATCGA   |

## 5. Resultados

### 5.1. Toxicidad del Metanol

A lo largo de este trabajo se utilizaron diferentes extractos de algas disueltos en metanol. Como paso previo a la evaluación del efecto antiviral de estos extractos, se consideró fundamental analizar su posible toxicidad sobre las células EPC. Para ello, se realizó un ensayo específico con el objetivo de determinar si el metanol empleado como disolvente podía ejercer un efecto citotóxico por sí solo. Este análisis permitió establecer las concentraciones seguras a utilizar en los experimentos posteriores.



**Figura 6.** Evaluación de la toxicidad del metanol a concentraciones de 1, 2, 5, 10, 15 y 20% en células EPC. Las células se fijaron con metanol a las 24h del tratamiento, se tiñeron con Giemsa y se midió la absorbancia a 570 nm. Cada punto representa el promedio de un triplicado con su desviación estándar, siendo la medida del triplicado sin tratamiento el 100% de supervivencia celular.

Hasta una concentración de metanol del 2% no se apreció una disminución significativa de la supervivencia celular (Figura 6), por lo que, a lo largo del trabajo, los extractos disueltos en medio de cultivo nunca superaron este porcentaje para asegurar el crecimiento óptimo de las células.

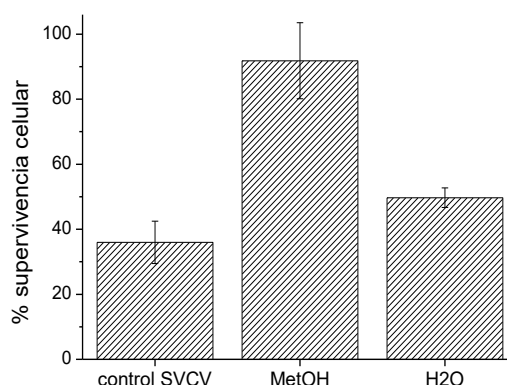
### 5.2. Efecto de extractos de *Chlamydomonas* sobre SVCV

#### 5.2.1. Pretratamiento con extracto metanólico y acuoso

Para evaluar el efecto del extracto del alga *Chlamydomonas* se realizó un ensayo de supervivencia celular. Estos ensayos consisten en poner en contacto el virus con las células y comparar el efecto citopático observado en las células tratadas frente al control infectado no

tratado. La supervivencia se expresa como porcentaje, siendo el 100% la absorbancia del control de células sin infectar y sin tratamiento.

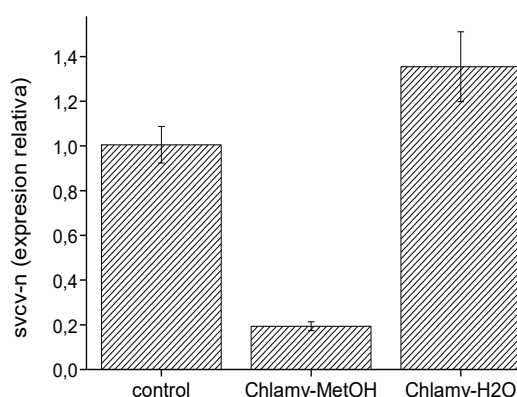
Se estudiaron los efectos del extracto metanólico y acuoso de *Chlamydomonas* llevando a cabo un tratamiento en células EPC, con el objetivo de comparar su capacidad protectora frente a la infección por SVCV. Para ello, se trataron las células con los extractos del alga 24 horas antes de la infección viral.



**Figura 7.** Evaluación del efecto de extractos en metanol: agua (80:20) y acuoso a concentración de 100µg/mL en células EPC frente a la infección por SVCV (moi=0,02 virus/célula). Las células se fijaron con metanol 2 días post-infección, se tiñeron con Giemsa, y se midió la absorbancia a 570 nm. Cada valor representa el promedio de un triplicado con su desviación estándar.

Se observó una protección próxima al 100% con el extracto metanólico, mientras que con el acuoso la supervivencia celular solo mejoró ligeramente.

Además, se recogieron muestras de las células 24 horas después de la infección para determinar la síntesis de ARN viral tras el tratamiento con ambos tipos de extractos.

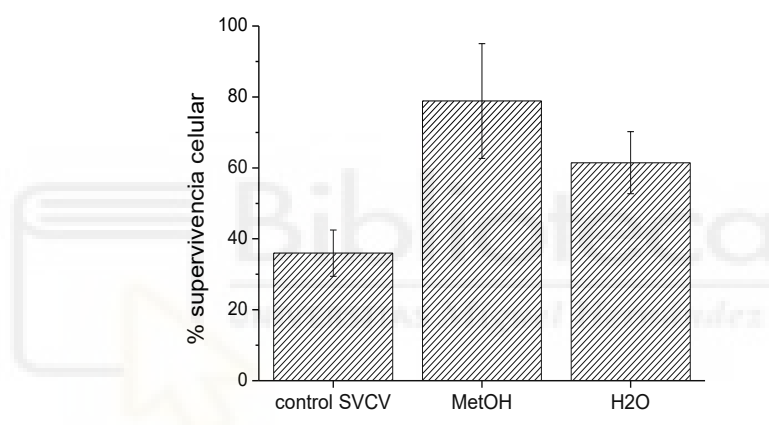


**Figura 8.** Evaluación síntesis ARN viral al usar extractos en metanol: agua (80:20) y acuoso a concentración de 100µg/mL en células EPC. Se midió el ARN viral por PCR cuantitativa (RT-qPCR), dando el valor 1 a la media del control. Cada valor representa el promedio de un triplicado con su desviación estándar.

Los resultados mostraron que solo el extracto metanólico fue capaz de reducir la síntesis de RNA viral en las células infectadas con SVCV, mientras que el extracto acuoso no tuvo ningún efecto inhibitor. Esto correlaciona bien con los resultados de supervivencia celular anteriormente mostrados.

### 5.2.2. Efecto de los extractos sobre la entrada de SVCV

Paralelamente, se realizaron ensayos de supervivencia celular para determinar la efectividad de los extractos metanólicos y acuosos de *Chlamydomonas* frente a la infección de SVCV, estando presentes durante la entrada del virus a la célula. Con ese fin, los extractos juntamente con el virus se ponen en contacto con las células durante las dos primeras horas de infección, tiempo en el que se considera que se produce la entrada del virus. Posteriormente se retiraron los extractos y la infección continuó en medio de cultivo normal.

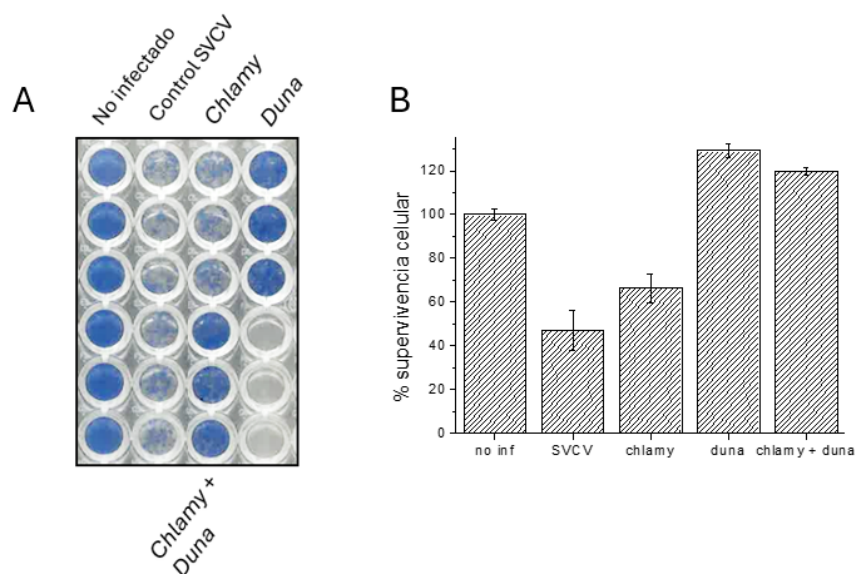


**Figura 9.** Evaluación del efecto de extractos de *Chlamydomonas* en metanol: agua (80:20) y acuoso a concentración de 100 µg/mL frente a la infección por SVCV (moi=0,02 virus/célula) en células EPC durante la entrada del virus. Las células se fijaron en metanol a los 2 dpi, se tiñeron con Giemsa, y se midió su absorbancia a 570 nm. Cada valor representa el promedio de un triplicado con su desviación estándar. Porcentaje de supervivencia celular en función del extracto.

En este caso, ambos extractos confirieron una resistencia frente a la infección por SVCV, siendo la del extracto metanólico algo mayor, pero no de manera significativa (Figura 9).

### 5.2.3. Comparación entre las algas *Chlamydomonas* y *Dunaliella*

Se realizó un nuevo ensayo de supervivencia celular mediante un tratamiento previo a la infección, esta vez incorporando el extracto metanólico del alga verde *Dunaliella*, para comparar sus efectos con los observados en *Chlamydomonas*.

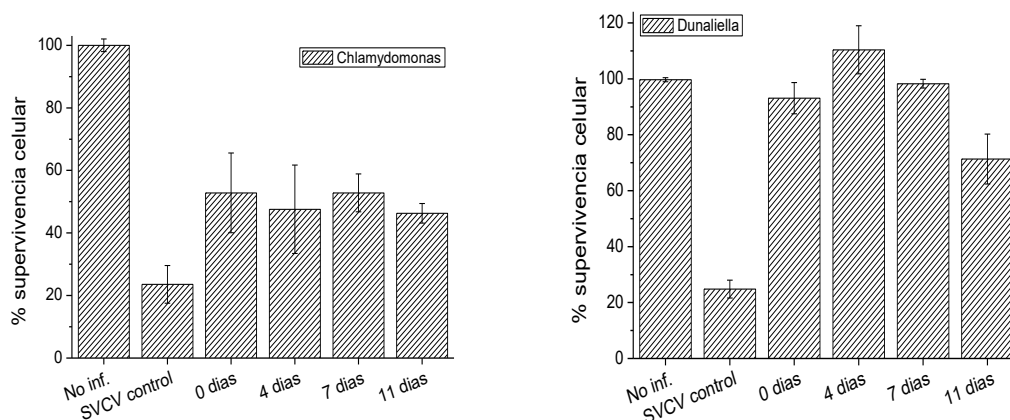


**Figura 10.** Evaluación del efecto de extractos en metanol: agua (80:20) de *Chlamydomonas* y *Dunaliella* a concentración 200 µg/mL los individuales y 100+100 µg/mL la mezcla frente a la infección por SVCV (moi=0,02 virus/célula) en células EPC con un pretratamiento de 24 horas previo a la infección. Las células se fijaron y tiñeron con Giemsa a los 2 dpi, y se midió la absorbancia a 570 nm. Los valores de no infectado y control de SVCV representan el promedio de un sextuplicado con su desviación estándar, y los valores de los extractos representan el promedio de un triplicado con su desviación estándar, siendo la media del sextuplicado del control no infectado y sin tratamiento el 100% de supervivencia celular. (A) Placa 96 pocillos teñida. (B) Gráfica supervivencia celular.

Los resultados del ensayo indicaron que tanto el extracto de *Dunaliella* como la combinación de extractos, presentaron el mayor efecto protector, inhibiendo totalmente la mortalidad celular (Figura 10). En comparación, en este experimento el extracto de *Chlamydomonas* no mostró una capacidad alta de inhibir el efecto citopático inducido por SVCV.

#### 5.2.4. Duración de la protección

Uno de los aspectos clave para evaluar el potencial terapéutico de un compuesto antiviral es la duración del efecto protector que proporciona tras su administración. En este apartado se analiza la persistencia en el tiempo de la protección conferida por los extractos de *Chlamydomonas* y *Dunaliella* frente a la infección por SVCV en diferentes días post tratamiento. Este tipo de análisis permite determinar no solo la eficacia inmediata del extracto, sino también su capacidad para inducir una respuesta sostenida que prolongue la viabilidad celular más allá del momento de aplicación.



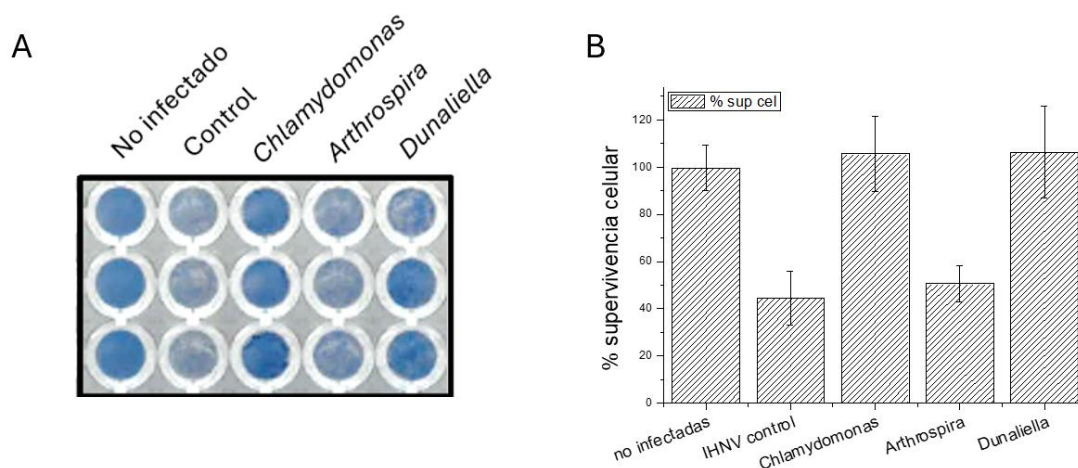
**Figura 11.** Evaluación del efecto de extractos en metanol: agua (80:20) de *Chlamydomonas* y *Dunaliella* a 100  $\mu$ l/mg frente a la infección por SVCV (moi=0,02 virus/células) en células EPC. Tras 11, 7, 4 y 0 días desde la retirada los extractos, se inició la infección con el virus. Las células se fijaron con metanol a los 2 dpi, se tiñeron con Giemsa y se midió la absorbancia a 570 nm. Cada valor representa el promedio de un triplicado con su desviación estándar, siendo la media del triplicado del control no infectado y sin tratamiento el 100% de supervivencia celular.

Los resultados muestran que mediante el uso del extracto de *Chlamydomonas* la protección frente a SVCV fue prácticamente igual independientemente de la duración del pretratamiento, llegando alrededor del 50% de viabilidad celular. Mientras que con el extracto de *Dunaliella* se observó una caída en la actividad protectora entre los 7 y 11 días tras el pretratamiento. También se observó que este mismo extracto presenta una acción antiviral mayor que *Chlamydomonas*, manteniéndose sobre el 90% de viabilidad celular incluso 7 días después de haber sido retirado (Figura 11).

### 5.3. Efecto de extractos de *Chlamydomonas* sobre IHNV

#### 5.3.1. Comparación *Chlamydomonas*, *Arthrospira*, *Dunaliella*

Con el fin de comparar el potencial del extracto de *Chlamydomonas* con el de otras microalgas, se evaluó la capacidad protectora de extractos metanólicos de *Chlamydomonas*, *Dunaliella* y *Arthrospira* frente a la infección por IHNV en células EPC. Con ese objetivo, se realizó un pretratamiento con los extractos 24 horas antes de la infección y se analizó la supervivencia celular como medida indirecta de la protección conferida por cada extracto.



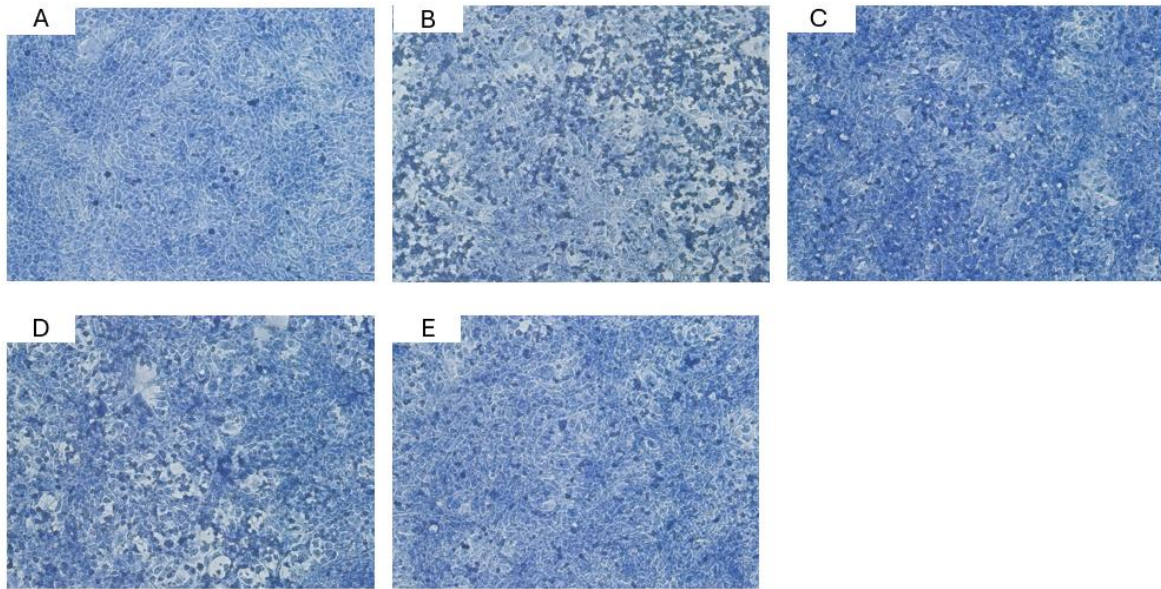
**Figura 12.** Porcentaje de supervivencia celular en células EPC con extractos metanólicos de *Chlamydomonas*, *Arthrospira* y *Dunaliella* con concentración 100 µg/mL frente a la infección por IHNV ( $\text{moi}=0,02$  virus/célula) después de un tratamiento de 24 horas. Las células se fijaron con metanol a los 7 dpi, se tiñeron con Giemsa y se midió la absorbancia a 570 nm. Cada punto representa el promedio de un triplicado con su desviación estándar, siendo la media del triplicado del control no infectado y sin tratamiento el 100% de supervivencia celular. (A) Placa 96 pocillo teñida. (B) Gráfica supervivencia celular.

Los resultados mostraron que los extractos metanólicos de *Chlamydomonas* y *Dunaliella* confirieron una protección completa frente a IHNV en condiciones de pretratamiento, alcanzando valores de supervivencia celular del 100%. En contraste, el extracto metanólico de *Arthrospira* no logró mejorar la supervivencia celular frente a la infección viral (Figura 12).

### 5.3.2. Pretratamiento *Chlamydomonas* y *Dunaliella*

Dado que en el apartado anterior se observó que el extracto de *Arthrospira* no presentaba un efecto inhibitorio significativo sobre IHNV, se repitió el experimento de pretratamiento utilizando únicamente los extractos de *Dunaliella* y *Chlamydomonas*, con el objetivo de determinar cuál de ellos mostraba una mayor actividad antiviral.

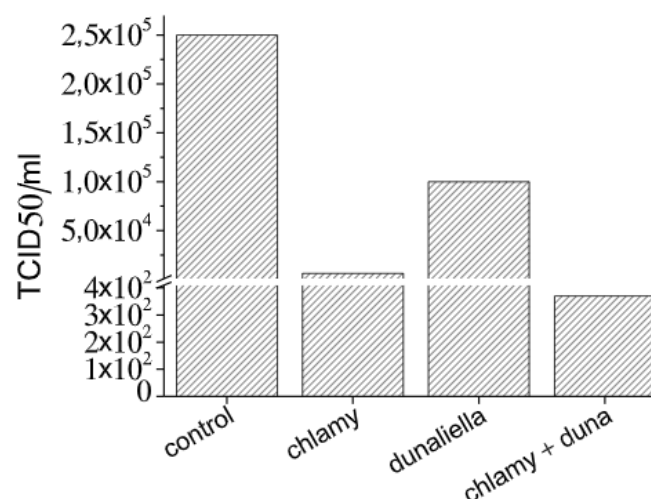
Se estudiaron los efectos de los extractos metanólicos de *Chlamydomonas*, *Dunaliella* y la combinación de ambos mediante un tratamiento previo de 24 horas a la infección en células EPC, donde se trataron con los extractos nombrados.



**Figura 13.** Evaluación del efecto de extractos de *Chlamydomonas* y *Dunaliella* en metanol: agua (80:20) de *Chlamydomonas* y *Dunaliella* a concentración 100 µg/mL por separado y una mezcla 50+50 µg/mL, frente a la infección por IHNV (moi=0,02 virus/célula) en células EPC con un pretratamiento de 24 horas previo a la infección. Las células se fijaron y tiñeron con Giemsa a los 10 dpi y se tomaron fotos al microscopio óptico (200X). (A) No infectado. (B) Control IHNV. (C) Pretratamiento con extracto *Chlamydomonas*. (D) Pretratamiento con extracto *Dunaliella*. (E) Pretratamiento con la mezcla de extractos *Chlamydomonas* y *Dunaliella*.

Las imágenes obtenidas mostraron que en el tratamiento combinando los extractos (*Chlamydomonas* + *Dunaliella*) se observa muy poca muerte celular, siendo el aspecto de la monocapa muy similar al observado en el control no infectado (A), lo que sugiere un mayor efecto protector frente a la infección por IHNV en células EPC. Por lo contrario, los extractos de *Chlamydomonas* y *Dunaliella* por separado no mostraron tanto efecto protector.

A continuación, se recogieron sobrenadantes de los pocillos infectados para determinar la TCID<sub>50</sub> (Dosis Infectiva en Cultivo Tisular al 50%), que es una medida cuantitativa del título de un virus, es decir, el número de partículas infectadas por ml.

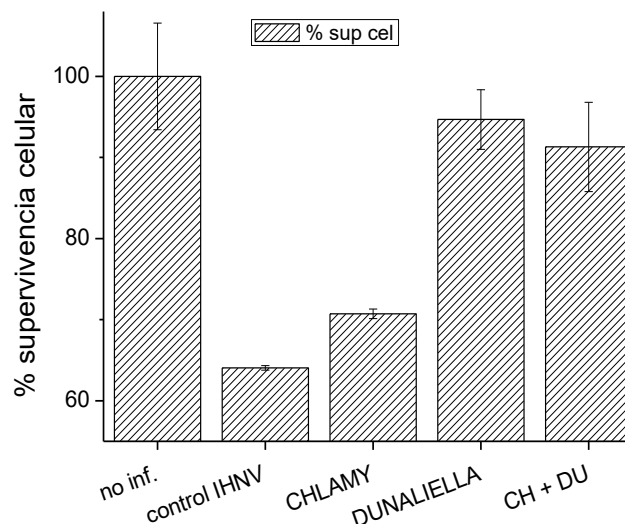


**Figura 14.** (TCID<sub>50</sub>) Determinación de la producción de virus en células pretratadas con los extractos metanólicos de *Chlamydomonas* y *Dunaliella* a una concentración de 100 µg/mL por separado y 50 + 50 µg/mL la mezcla de ellos, con infección por IHNv (moi=0,02 virus/célula) en células CHSE con un pretratamiento de 24 horas previo a la infección. Se realizó a partir de sobrenadantes recogidos 10 dpi. Las células se tiñeron con Cristal violeta 12 dpi.

Los resultados indicaron que los extractos de *Chlamydomonas* y la mezcla de *Chlamydomonas* y *Dunaliella*, tuvieron un efecto mayor de protección frente a la infección por IHNv ya que presentaron valores inferiores de TCID<sub>50</sub>, logrando una reducción de tres órdenes de magnitud en el título del virus (Figura 14).

### 5.3.3. Efecto de *Chlamydomonas* y *Dunaliella* durante la entrada

Paralelamente, se realizaron ensayos de supervivencia celular para evaluar la efectividad de extractos metanólicos de *Chlamydomonas* y *Dunaliella* frente a la infección por IHNv durante la entrada. Con ese fin, los extractos y el virus se incubaron juntamente con las células durante las dos primeras horas de infección, tiempo en el que se considera que se produce la entrada del virus a las células. Seguidamente se retiran y la infección prosigue en medio de cultivo normal.



**Figura 15.** Evaluación del efecto durante la entrada de extractos de *Chlamydomonas* y *Dunaliella* en metanol: agua (80:20), con una concentración de 100 µg/mL por separado y 50+50 µg/mL la mezcla de ambos, frente a la infección por IHN (moi=0,02 virus/célula) en células EPC. Las células se fijaron con metanol a los 13 dpi, se tiñeron con Giemsa, y se midió su absorbancia a 570 nm. Cada valor representa el promedio de un triplicado con su desviación estándar, siendo la media del triplicado del control no infectado y sin tratamiento el 100% de supervivencia celular. Porcentaje de supervivencia celular en función del extracto.

Estos resultados afirman que el extracto de *Dunaliella* y la mezcla de *Dunaliella* y *Chlamydomonas* fueron los más efectivos frente a la infección por IHN en células EPC. Y a su vez, se observó que el extracto metanólico de *Dunaliella* fue el que presentó mayor efecto durante la entrada del virus (Figura 15).

## 6. Discusión

La prevención y el control de las enfermedades virales representan uno de los mayores retos para la acuicultura actual, dado el crecimiento y la relevancia económica de las especies cultivadas. La continua emergencia de nuevas patologías y la alta tasa de mutación de numerosos virus limitan la eficacia de las medidas de control de amplio espectro, y aunque las vacunas representen una estrategia clave para combatir estas enfermedades, su desarrollo requiere largos periodos de investigación y elevados costes (Kibenge, 2029; Mugimba et al., 2021).

En este contexto, desde siempre ha habido un interés en la identificación de compuestos antivirales naturales que puedan reforzar y complementar las estrategias tradicionales. Estos compuestos naturales pueden constituir una alternativa a los fármacos sintéticos de alto coste con efectos secundarios indeseables, además de facilitar el acceso a la población (Reynolds et al., 2021).

Por un lado, encontramos las plantas medicinales, de las que se ha documentado su efecto como tratamientos complementarios útiles para diversas enfermedades. Aunque pocas se hayan aplicado al tratamiento de enfermedades virales, muchas pueden ser candidatas para el descubrimiento de nuevos antivirales debido a su potente actividad antiviral, sus escasos efectos secundarios y su capacidad para inhibir la replicación o síntesis de algunos genomas virales (Gomes et al., 2022).

Por otro lado, las algas y microalgas destacan como una de las fuentes más prometedoras de compuestos antivirales e inmunoestimulantes (Ma et al., 2020). En este sentido, Hayashi et al. identificaron en *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) un compuesto antiviral, el espirulano de calcio, capaz de inhibir la entrada de virus con envoltura membranosa en las células huésped. Asimismo, Ayehunie et al. (1998) demostraron que un extracto acuoso de *S. platensis* inhibía la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) en líneas celulares T humanas, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células de Langerhans. Más recientemente, Fritzsche et al. (2021) describieron también una actividad antiviral en *Chlamydomonas* frente al herpesvirus de la carpa koi (CyHV-3).

Tanto en este trabajo como en los estudios de Fritzsche et al. (2021) y García-Ruiz et al. (2022) se ha demostrado que el pretratamiento con los extractos de algas antes de la infección viral disminuye el efecto citopático, esto es, el daño que el virus provoca en el cultivo celular, que culmina con la lisis celular. En Ren et al. (2022) los resultados muestran que el pretratamiento proporciona mejor efecto antiviral que durante la entrada o cuando está presente después de la

infección. En Fritzche et al. (2021) también se demostró el efecto antiviral de las algas durante la entrada de un herpes de pez en células de carpa.

A lo largo del presente estudio se realizaron los experimentos con los extractos disueltos tanto en disolvente acuoso como metanólico, dado que existen ciertas diferencias en sus perfiles de LC-MS que podrían afectar al efecto antiviral. El análisis por espectrometría de masas (MS) de los extractos fue llevado a cabo por el Dr. Bryan Moreno, del Grupo de Ingredientes Funcionales del Dr. Manuel Valero (IDiBE).

Los materiales de origen vegetal responden de manera distinta a la selectividad de extracción gobernada por la polaridad del disolvente y las interacciones soluto-disolvente. El metanol reduce las interacciones intermoleculares presentes en la matriz biológica y favorece la solubilización de metabolitos de polaridad media, mientras que el agua extrae preferentemente compuestos polares. Estas diferencias en la eficiencia de extracción originan variaciones cualitativas y cuantitativas en la composición química detectada por LC-MS (Alsañafi et al., 2025).

Aunque este trabajo se centra en los extractos de las microalgas *Chlamydomonas* y *Dunaliella*, existen otras especies que también han demostrado actividad antiviral. Entre ellas destacan *Chlorella*, *Nostoc* y *Arthrospira*, cuyos compuestos bioactivos han mostrado capacidad para inhibir la replicación viral o interferir en distintas etapas de la infección (Reynolds et al., 2021; Yang et al., 2018; Fritzsche et al., 2021). Además, una línea de investigación especialmente relevante es la combinación de extractos procedentes de diferentes microalgas, ya que puede generar efectos sinérgicos que potencien su actividad antiviral. En relación con ello, Morán-Santibañez et al. (2018) demostraron que la utilización combinada de dos extractos puede mejorar significativamente su actividad virucida frente al virus del sarampión, en comparación con su aplicación individual.

La duración de la protección de las células a subsiguiente infección por un virus es un aspecto importante desde el punto de vista práctico, ya que determina el tiempo durante el cual el agente antiviral, en este caso el extracto del alga, mantiene su eficacia tras la aplicación. Una protección prolongada puede reducir la frecuencia de administración del tratamiento, lo que supone una ventaja tanto en términos de coste como de facilidad de uso. Además, una mayor persistencia de la actividad antiviral resulta relevante en entornos con alto riesgo de exposición a patógenos, donde es necesario garantizar una protección continua y eficaz. Por ello, además de evaluar la potencia antiviral de los extractos de *Chlamydomonas* y *Dunaliella*, también se ha analizado la duración de su efecto protector a lo largo del tiempo, observando que el efecto

protector del extracto metanólico de *Dunaliella* se mantuvo elevado durante los primeros 7 días, si bien acaba disminuyendo a los 11 días, aunque permaneciendo claramente por encima del control infectado. Por otra parte, el extracto de *Chlamydomonas* mostró una actividad protectora moderada y relativamente constante a lo largo de los 11 días de evaluación, sin variaciones significativas en su capacidad de promover la supervivencia celular.

Hay que tener en cuenta que en este estudio los ensayos se realizaron exclusivamente en condiciones *in vitro*, utilizando cultivos celulares de las líneas EPC (carpa) y CHSE (salmón). Aunque estos modelos son muy útiles para evaluar la actividad antiviral de los extractos, los resultados obtenidos habrán de ser validados posteriormente en peces en condiciones de laboratorio; y finalmente, en condiciones reales de producción acuícola, donde intervienen factores adicionales como la respuesta inmunitaria, la biodistribución de los compuestos o su digestión y metabolismo en el interior del animal.

Además, aunque se observó una actividad protectora frente a SVCV e IHNV, los mecanismos moleculares responsables de dicha protección no han podido investigarse en profundidad. La protección mediante pretratamiento indica que podría deberse a una respuesta inmune innata, como sugieren resultados preliminares obtenidos por el grupo (Vicedo, 2025). Nuestros resultados también sugieren una posible interferencia en etapas tempranas de la infección viral, como la entrada del virus en la célula, tesis que también apoyan otros autores (Srisai, 2024). Serán necesarios estudios adicionales para deducir qué contribución tiene cada uno de estos factores.

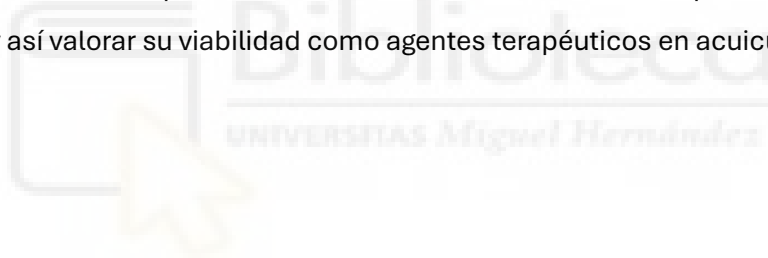
También hay que tener en cuenta que los extractos empleados son mezclas complejas de compuestos bioactivos, por lo que no es fácil identificar qué moléculas concretas son responsables de la actividad antiviral observada. En consecuencia, serán necesarios estudios posteriores dirigidos al aislamiento e identificación de los principios activos implicados y sus mecanismos de acción. Se han propuesto los flavonoides (Fonseca et al., 2025), y los polifenoles (Reynolds et al., 2021) como moléculas capaces de inhibir la infección viral.

Las concentraciones de extracto utilizadas fueron constantes entre experimentos, por lo que sería conveniente realizar estudios adicionales con dosis más bajas, para determinar la concentración mínima eficaz, la dosis óptima y el margen de seguridad de los tratamientos. El empleo de concentraciones más bajas permitiría evaluar los posibles efectos sinérgicos entre los extractos de *Chlamydomonas* y *Dunaliella*, y así establecer estrategias de tratamiento más eficientes.

Las condiciones experimentales, los tiempos de exposición y los métodos de tratamiento pueden influir en la eficacia observada. Por ello, sería conveniente llevar a cabo estudios adicionales que permitan optimizar estos parámetros y determinar con mayor precisión la duración de la protección conferida por los extractos. Además, la duración de la protección antiviral únicamente se evaluó durante un periodo de tiempo limitado, por lo que, estudios más prolongados permitirían determinar hasta dónde puede llegar la persistencia del efecto protector.

La finalidad de este estudio era determinar la actividad antiviral de los extractos frente a dos virus pertenecientes a la familia *Rhabdoviridae* (IHNV y SVCV), por lo que, aunque los resultados muestran un potencial antiviral prometedor, no puede asumirse que estos efectos se reproduzcan frente a otros tipos de virus que infectan a los peces, o en líneas celulares procedentes de otras especies de pez.

Finalmente, será necesario investigar la estabilidad de los extractos y su eficacia a largo plazo en condiciones más próximas a las aplicaciones reales, realizando estudios *in vivo*. De esta manera se podrán evaluar los posibles efectos tóxicos asociados a la exposición de los peces a estos extractos, y así valorar su viabilidad como agentes terapéuticos en acuicultura.



## 7. Conclusiones

Los extractos metanólicos de las microalgas mostraron una actividad antiviral superior a la de los extractos acuosos. Tanto los ensayos de pretratamiento como los de entrada viral indicaron que estos extractos son capaces de interferir en las primeras etapas de la infección, lo que sugiere que parte de su actividad antiviral se produce durante la entrada del virus en la célula. No obstante, la actividad antiviral en los ensayos de pretratamiento era superior a cuando el extracto se aplicaba durante la entrada del virus.

En cuanto a la protección frente a SVCV, *Dunaliella salina* mostró una elevada eficacia, proporcionando en algunos ensayos una mayor protección que *Chlamydomonas reinhardtii*. Frente a IHNV, los extractos de *Chlamydomonas reinhardtii* y *Dunaliella salina* protegieron eficazmente a las células frente al efecto citopático, mientras que el extracto de *Arthrospira* no mostró una actividad antiviral significativa en las condiciones estudiadas. Esta diferencia puede deberse a que mientras *Chlamydomonas reinhardtii* y *Dunaliella salina* son algas verdes, *Arthrospira* es una cianobacteria.

La combinación de extractos de *Chlamydomonas reinhardtii* y *Dunaliella salina* mejoró la protección antiviral frente a SVCV e IHNV en comparación con algunos tratamientos individuales, lo que sugería un posible efecto complementario entre ambas microalgas, pero que en este trabajo no queda suficientemente demostrado.

En relación con la duración de la protección, a posterior infección con SVCV, se observó que tanto para *Chlamydomonas reinhardtii* como para *Dunaliella salina* la protección antiviral se mantuvo al menos durante un periodo de 7 días.

Los resultados obtenidos respaldan el potencial de los extractos metanólicos de microalgas, especialmente los de *Chlamydomonas reinhardtii* y *Dunaliella salina*, tanto de forma individual como combinada, como candidatos para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento y control de enfermedades víricas en acuicultura. No obstante, serán necesarios estudios adicionales para identificar los compuestos responsables de esta actividad y validar su eficacia en condiciones *in vivo*.

## 8. Agradecimientos

Gracias a mis padres, por siempre darme más de lo que tienen para conseguir todo lo que me propongo y vivir todas las experiencias que ellos no han podido. Y aunque no os lo diga casi, os quiero un montón y estoy super agradecida por todo, un trozo de este trabajo es vuestro. Nada de esto sería posible sin vosotros.

Gracias a mi familia, en especial a mi abuela Conchín, por todo el apoyo y el amor recibido.

Gracias a Raquel, Berta, Bea, Paula y Candela, porque son ese lugar donde hay amor incondicional, porque aun estando a kilómetros de cada una intentamos estar presentes y porque las elegiría toda la vida.

Gracias a Portugal, por darme el respiro que tanto necesitaba y por darme a personas que me llevo para siempre, fueron 10 meses inolvidables.

Gracias a mí, por todo el esfuerzo, por todas las lágrimas y sobre todo por no rendirme. Ya lo he conseguido.



## 9. Bibliografía

Alsahafi, T., Bouback, T., Albeshri, A., Alnhhas, S., Ali, M., Moatasim, Y., Kutkat, O., Gaballah, M., Alfasi, F., Mater, E. H., Al-Sarraj, F., Badierah, R., Alotibi, I. A. and Almulaiky, Y. Q. (2025). Antiviral potential of *Melissa officinalis* extracts against influenza and emerging coronaviruses, *Sci Rep* 15 (1) 12118. doi: 10.1038/s41598-025-06237-w

APROMAR, Asociación Empresarial de Acuicultura de España (2025). La Acuicultura en España 2025.

Astorga-Gonzalez, B., Villalobos-Sanchez, E., Gutierrez-Ortega, A., Bravo-Madrigal, J., Mateos-Diaz, J. C., & Elizondo-Quiroga, D. (2025). *In vitro antiviral activity of Chlorella vulgaris extracts and fractions against SARS-CoV-2. Natural Product Research.* doi: 10.1080/14786419.2025.2499920

Carbone, D. A., Pellone, P., Lubritto, C., & Ciniglia, C. (2021). Evaluation of microalgae antiviral activity and their bioactive compounds. *Antibiotics*, 10(6), 746. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060746>

Fabregas, J., Garcia, D., Fernandez-Alonso, M., Rocha, A. I., Gomez-Puertas, P., Escribano, J. M., Otero, A., & Coll, J. M. (1999). In vitro inhibition of the replication of haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and African swine fever virus (ASFV) by extracts from marine microalgae. *Antiviral Research*. PII: S0166-3542(99)00049-2

Fritzsche, S., Blenk, P., & Reiter, L. (2021). Inhibitory properties of crude microalgal extracts on the in vitro replication of cyprinid herpesvirus 3. *Scientific Reports*, 11(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02542-2>

García-Ruiz, D., Villalobos-Sánchez, E., Alam-Escamilla, D., & Elizondo-Quiroga, D. (2022). *In vitro inhibition of SARS-CoV-2 infection by dry algae powders. Scientific Reports.* <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22148-6>

Gomes, P. W. P., Martins, L., Gomes, E., Muribeca, A., Pamplona, S., Komesu, A., Bichara, C., Rai, M., Silva, C., & Silva, M. (2022). *Antiviral plants from Marajó Island, Brazilian Amazon: A narrative review.* *Molecules*, 27(5), 1542. <https://doi.org/10.3390/molecules27051542>

Jassim, S.A.A. and Naji, M.A., 2003, Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective, *J. Applied Microbiol* 95: 412-427. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02026.x

Jiang, W., Xu, W., Yang, L., Yang, W., Li, Z., Huang, R., Huang, Z., Shao, S., & Liu, Q. (2025). *An mRNA-LNP vaccine encoding glycoprotein provides effective protection against infectious*

*hematopoietic necrosis virus in rainbow trout.* npj Vaccines, 10, 162.  
<https://doi.org/10.1038/s41541-025-01222-w>

Jiao, X., Lu, Y.-t., Wang, B., Guo, Z.-y., Qian, A.-d., & Li, Y.-h. (2023). *Infection of epithelioma papulosum cyprini (EPC) cells with spring viremia of carp virus (SVCV) induces autophagy and apoptosis through endoplasmic reticulum stress.* Microbial Pathogenesis, 183, 106293.  
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106293>

Kamei, Y., & Aoki, M. (2007). A chlorophyll c2 analogue from the marine brown alga *Eisenia bicyclis* inactivates the fish rhabdovirus, viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Archives of Virology*, 152(11), 2047-2053. DOI: 10.1007/s00705-006-0920-y

Kibenge, F.S.B. 2019. Emerging viruses in aquaculture. *Curr. Op. Virol*, 34, 97-103.  
DOI: [10.1016/j.coviro.2018.12.008](https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.12.008)

Kim, S. Y., Kim, S. R., Oh, M. J., Jung, S. J., & Kang, S. Y. (2011). In Vitro antiviral activity of red alga, *Polysiphonia morrowii* extract and its bromophenols against fish viruses. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(8), 841-851. DOI: 10.1007/s12275-011-1035-z

Ma, K., Bao, Q., Wu, Y., Chen, S., Zhao, S., Wu, H. and Fan, J., 2020, Evaluation of Microalgae as Immunostimulants and Recombinant Vaccines for Diseases Prevention and Control in Aquaculture, *Front Bioeng Biotechnol* 8, 590431. doi: [10.3389/fbioe.2020.590431](https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.590431)

Mkulo, E. M., Wang, B., Amoah, K., Huang, Y., Cai, J., Jin, X., & Wang, Z. (2024). *The current status and development forecasts of vaccines for aquaculture and its effects on bacterial and viral diseases.* Microbial Pathogenesis, 196, 106971. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.106971>

Monteiro, M., Lavrador, A. S., Rocha, S., & Sousa, R. (2021). Evaluation of the Potential of Marine Algae Extracts as a Source of Functional Ingredients for Food and Nutraceutical Applications. *Marine Biotechnology*, 23, 1-15. <https://doi.org/10.1007/s10126-021-10044-5>

Morán-Santibañez, K., Peña-Hernández, M. A., Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Skouta, R., Vasquez, A. H., Rodríguez-Padilla, C., & Trejo-Avila, L. M. (2018). *Virucidal and synergistic activity of polyphenol-rich extracts of seaweeds against measles virus.* Viruses, 10(9), 465. <https://doi.org/10.3390/v10090465>

Mugimba, K. K., Byarugaba, D. K., Mutoloki, S., Evensen, O. and Munang'andu, H. M., 2021, Challenges and Solutions to Viral Diseases of Finfish in Marine Aquaculture, *Pathogens*, 10. doi: [10.3390/pathogens10060673](https://doi.org/10.3390/pathogens10060673)

Ren, G., Xu, L., Li, H., & Lu, Y. (2022). Antiviral Activity of Crude Polysaccharide Derived from Seaweed against IHNV and IPNV. *Viruses*, 14(7), 1478. <https://doi.org/10.3390/v14092080>

Reynolds, D., & Huesemann, M. (2021). Viral inhibitors derived from macroalgae, microalgae, and cyanobacteria: A review of antiviral activities and mechanisms. *Algal Research*, 54, 102197. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102331>

Sarabia Ibarra, Jose Manuel. Actividad antiviral de extractos de algas frente a virus de peces. Universidad Miguel Hernández, 2024.

Sasikumar, R., Saranya, S., Lourdu Lincy, L., Thamanna, L., & Chellapandi, P. (2024). *Genomic insights into fish pathogenic bacteria: A systems biology perspective for sustainable aquaculture. Fish and Shellfish Immunology*, 174, 109978. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109978>

Srisai, P., Suriyaprom, S., Panya, A., Pekkoh, J. and Tragoolpua, Y., 2024, Inhibitory effects of algal polysaccharide extract from *Cladophora* spp. against herpes simplex virus infection, *Sci Rep* 14, 11914. **DOI:** 10.1038/s41598-024-60941-7

Su, H., & Su, J. (2018). *Cyprinid viral diseases and vaccine development. Fish & Shellfish Immunology*, 83, 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.003>

Vicedo Saura, Irene. Actividad antiviral de extractos del alga *Chlamydomonas reinhardtii* frente al virus de la viremia primaveral de la carpa. Universidad Miguel Hernández, 2025.

Wong, Z. C., Alwie, N. A. M., Lim, L. S., Sano, M., & Mohamad Lal, M. T. (2024). *Potential biocontrol for bacterial and viral disease treatment in aquaculture: A minireview. Journal of Microorganism Control*, 29(3), 99–103. DOI: 10.4265/jmc.29.3\_99

Yang, H. K., Jung, M. Y., Kim, S. Y., & Kang, S. Y. (2018). Efficacy of algal *Ecklonia cava* extract against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Fish and Shellfish Immunology*, 72, 273-278. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.10.044>