



Trabajo Fin de Grado

**Actividad antiviral de extractos del alga
Chlamydomonas reinhardtii frente al virus de
la viremia primaveral de la carpa**



Autora: Irene Vicedo Saura

Tutor: Luis Pérez García-Estañ

Cotutora: Ainhoa Gómez Quintanilla

Departamento de Bioquímica y Biología Celular

Curso académico 2024-2025

Índice

1. Introducción.....	6
1.1. Acuicultura.....	6
1.2. Enfermedades víricas en acuicultura.....	7
1.3. La viremia primaveral de la carpa (SVCV).....	8
1.4. Extractos de origen vegetal como tratamiento antiviral.....	10
1.5. La microalga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	11
2. Antecedentes.....	13
3. Objetivos.....	13
4. Materiales y métodos.....	14
4.1. Algas utilizadas en este trabajo.....	14
4.2. Línea celular EPC y virus SVCV.....	14
4.3. Preparación de extractos.....	14
4.3.1. Preparación de extractos en metanol- agua (80:20).....	14
4.3.2. Preparación de extractos en agua	14
4.4. Preparación de tinciones.....	15
4.5. Ensayos de actividad antiviral.	15
4.5.1. Ensayo de actividad antiviral durante la entrada del virus.....	15
4.5.2. Ensayo de actividad antiviral por pretratamiento con los extractos.....	15
4.6. Captura de imágenes en microscopio óptico.....	16
4.7. Análisis estadístico.....	16
4.8. Análisis de la expresión de genes por qPCR.....	16
5. Resultados.....	18
5.1. Toxicidad del extracto metanólico.....	18
5.1.1. Toxicidad del metanol y extractos.....	18
5.2. Actividad mediante pretratamiento	19
5.3. Actividad durante la entrada del virus.....	22
5.4. Actividad durante la infección.....	24
5.5. Duración de la protección.....	25

5.6. Estimulación de genes de respuesta inmunitaria.....	26
5.7. Comparación de la actividad antiviral de extracto de <i>Chlamydomonas</i> con la de un extracto de <i>Dunaliella salina</i>	28
6. Discusión	30
7. Conclusiones.	34
8. Perspectivas futuras.	35
9. Referencias.	36



Resumen

La acuicultura es un sector productivo en expansión que se ve frecuentemente amenazado por enfermedades víricas, especialmente aquellas causadas por rhabdovirus como el virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV). La limitada disponibilidad de tratamientos antivirales eficaces ha impulsado la búsqueda de alternativas naturales, entre ellas, el uso de microalgas como fuente de compuestos bioactivos.

Este trabajo evalúa el efecto antiviral de extractos acuosos y metanólicos de diferentes especies de microalgas verdes, con especial atención a *Chlamydomonas reinhardtii*, frente al SVCV en cultivos celulares. Se realizaron ensayos por pretratamiento y durante la entrada e infección viral para identificar en qué etapa del ciclo viral podrían actuar dichos extractos. Los resultados muestran que el extracto metanólico presenta, en general, una mayor eficacia antiviral que el acuoso, posiblemente debido a contenido en compuestos lipofílicos con potencial bioactivo. En el caso de *Chlamydomonas*, el extracto metanólico mostró una reducción significativa del efecto citopático del SVCV, mientras que el extracto acuoso fue menos efectivo.

Estos hallazgos refuerzan el interés por las microalgas como candidatas a agentes antivirales naturales en acuicultura, y abren la puerta a futuras investigaciones que podrían incluir su aplicación como aditivo dietético o probiótico en peces, con el objetivo de prevenir infecciones virales de forma sostenible y segura.

Palabras clave

Acuicultura, virus de peces, SVCV, extractos algales, microalgas, antivirales, *Chlamydomonas reinhardtii*.

Abstract

Aquaculture is a growing productive sector that is frequently threatened by viral diseases, particularly those caused by rhabdoviruses such as the spring viremia of carp virus (SVCV). The limited availability of effective antiviral treatments has encouraged the search for natural alternatives, including the use of microalgae as a source of bioactive compounds.

This study evaluates the antiviral effect of aqueous and methanolic extracts from different species of green microalgae, with special attention to *Chlamydomonas reinhardtii*, against SVCV in cell cultures. Treatments were carried out as pretreatments and

during viral entry and infection in order to identify the stage of the viral cycle at which the extracts might act. The results show that methanolic extracts generally exhibit greater antiviral activity than aqueous extracts, possibly due to their ability to extract lipophilic compounds with bioactive potential. In the case of *Chlamydomonas*, the methanolic extract showed a significant reduction in the cytopathic effect of SVCV, whereas the aqueous extract was showed less activity.

These findings support the potential of microalgae as natural antiviral agents in aquaculture and pave the way for future research exploring their application as dietary additives or probiotics in fish, aiming to prevent viral infections in a safe and sustainable manner.

Keywords

Aquaculture, fish viruses, SVCV, algal extracts, microalgae, antivirals, *Chlamydomonas reinhardtii*.



1. Introducción

1.1. Acuicultura.

La acuicultura se ha convertido en un sector clave para satisfacer la creciente demanda mundial de productos acuáticos, ante la limitada capacidad de la pesca de captura. Esta actividad no solo contribuye a la seguridad alimentaria global, sino que también impulsa el desarrollo económico en comunidades ribereñas y costeras. En 2022, la producción mundial de acuicultura alcanzó un récord histórico de 223,2 millones de toneladas, de las cuales 130,9 millones correspondieron a animales acuáticos, con un valor estimado de 313.000 millones de dólares, superando por primera vez a la pesca de captura en términos de producción de animales acuáticos (FAO, 2024).

La carpa (*Cyprinus carpio*) es una de las especies de pez más importantes en la acuicultura a nivel mundial. En 2022, la producción global de carpa alcanzó los 6,3 millones de toneladas, lo que representa alrededor del 5% de la producción total de especies acuáticas en el sector. Este cultivo se concentra principalmente en Asia, con China como líder, seguido por India y Vietnam. En Europa, países como Polonia, Hungría y Rumanía también tienen una producción significativa de carpa, especialmente en sistemas de acuicultura extensiva en aguas dulces (FAO, 2024).

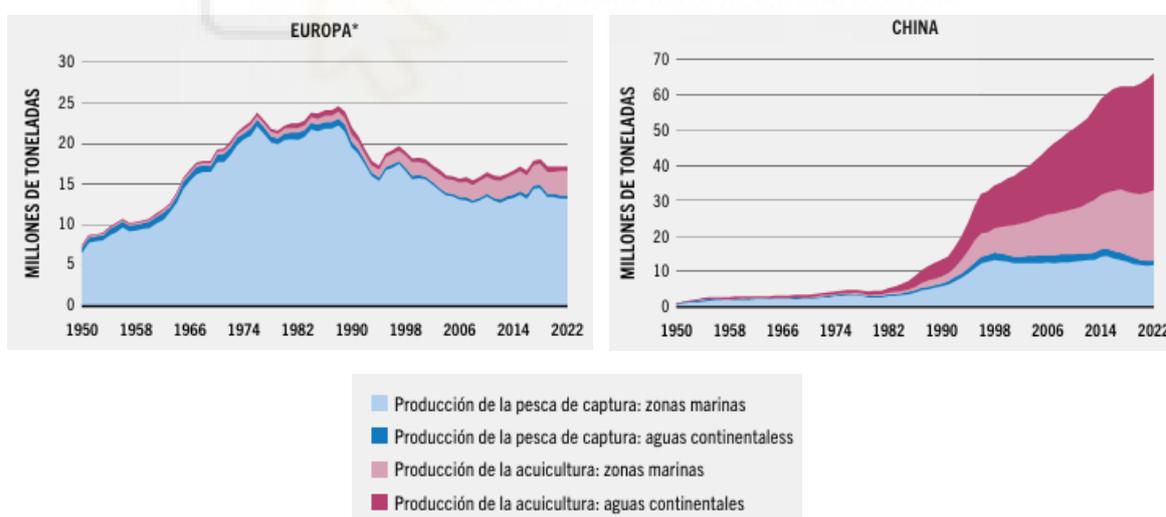


Figura 1. Producción de especies acuáticas en Europa y China. Fuente: FAO. 2024.

La carpa es apreciada por su adaptabilidad a diversas condiciones ambientales y su capacidad para crecer en sistemas de cultivo de bajo costo. Además, su carne es valorada por su sabor y textura, lo que la convierte en un alimento básico en muchas culturas (Reynolds et al., 2021). Sin embargo, el cultivo de carpa se enfrenta a desafíos relacionados con la sostenibilidad y la salud animal. La intensificación de la acuicultura y

las condiciones de alta densidad pueden aumentar el riesgo de enfermedades, lo que requiere una gestión adecuada de los recursos y prácticas de manejo responsables para garantizar la salud de los ecosistemas acuáticos y la seguridad alimentaria (Shen et al., 2017).

1.2. Enfermedades víricas en acuicultura.

La carpa puede verse afectada por diversas enfermedades causadas por hongos, bacterias o virus. En este trabajo, nos vamos a enfocar en las de origen viral, ya que representan uno de los principales retos para la acuicultura actual. Esto se debe a que los virus se propagan con facilidad, evolucionan rápidamente y, en la mayoría de los casos, no existen tratamientos efectivos para combatirlos. Varios estudios han demostrado que estas infecciones pueden ocasionar importantes pérdidas económicas, perjudicando tanto la productividad como la calidad del pescado que llega al mercado (Faheem et al., 2021).

Las condiciones que suelen darse en las piscifactorías, como la alta densidad de peces, los cambios bruscos en la calidad del agua o el estrés constante, favorecen el desarrollo y la transmisión de estos virus, especialmente en las etapas más tempranas de vida. Entre las enfermedades más importantes destacan la viremia primaveral de la carpa (SVCV), que afecta sobre todo a la carpa común y a la carpa koi; la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV), más frecuente en truchas y salmones; y la septicemia hemorrágica viral (VHSV), que puede afectar a una amplia variedad de especies tanto de agua dulce como salada (Faheem et al., 2021).

También se han registrado casos del rhabdovirus de la perca negra (MSRV) en cultivos de *Micropterus salmoides*, con consecuencias graves para la supervivencia y la respuesta inmunitaria de los ejemplares afectados. Otro virus de gran impacto es el nodavirus o virus de la necrosis nerviosa viral (NNV), causante de encefalopatía y retinopatía viral. Este ha provocado brotes importantes en especies marinas como la dorada (*Sparus aurata*) y la lubina (*Dicentrarchus labrax*), afectando principalmente a alevines y juveniles, que presentan tasas de mortalidad muy elevadas.

Además de reducir la supervivencia y el crecimiento, estas enfermedades pueden modificar el aspecto externo, la textura o incluso el sabor del pescado, lo cual afecta directamente su valor en el mercado. Esto tiene un impacto en toda la cadena de producción, desde el productor hasta el consumidor, y pone en riesgo la rentabilidad de los sistemas acuícolas. Por todo esto, la sanidad en acuicultura se ha convertido en una prioridad para el sector. Aunque se han identificado compuestos con potencial antiviral y

resultados prometedores en estudios de laboratorio (Wang et al., 2024), la mayoría todavía no están disponibles para uso comercial. Por ahora, la forma más eficaz de evitar brotes sigue siendo la prevención y un manejo adecuado del entorno de cultivo.

1.3. La viremia primaveral de la carpa (SVCV).

El virus de la viremia primaveral de la carpa (Spring Viremia of Carp Virus, SVCV) es un patógeno viral perteneciente a la familia *Rhabdoviridae*, un grupo de virus con genoma ARN monocatenario de polaridad negativa que se caracterizan por su forma de bala, debido a la simetría helicoidal de su cápside. Entre los rhabdovirus, hay algunos de gran importancia en acuicultura, por su capacidad para provocar infecciones graves en peces, con efectos tanto en especies comerciales como ornamentales. Este tipo de virus tiene una amplia distribución geográfica, siendo responsables de enfermedades como la viremia primaveral de la carpa, que afecta principalmente a especies de carpas, incluyendo la carpa común (*Cyprinus carpio*) y la carpa koi (*Cyprinus carpio koi*) (Shen et al., 2017).

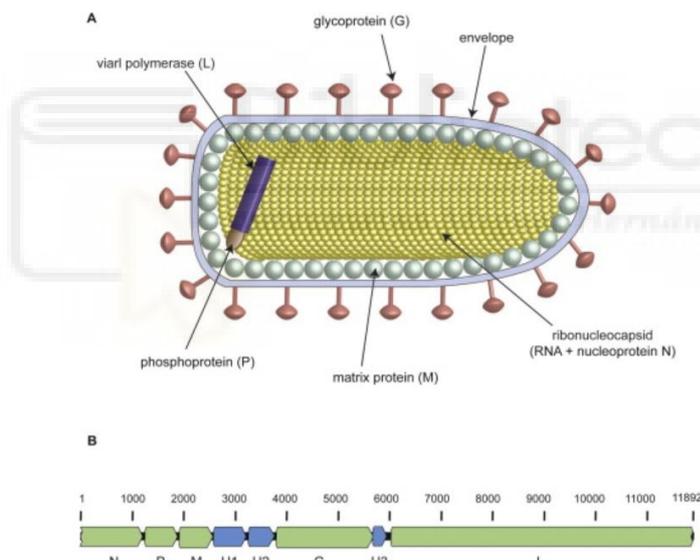


Figura 2. Estructura de la partícula viral (A) y organización del genoma (B) de Rhabdovirus. Fuente: Stich (2014).

Los virus de la familia *Rhabdoviridae*, como el SVCV, inician su ciclo infeccioso introduciéndose en la célula mediante un proceso de endocitosis dependiente de receptor, facilitado por la glicoproteína G, que se une a moléculas específicas en la superficie de la célula huésped. Tras la internalización, la acidificación del endosoma provoca cambios conformacionales en la envoltura viral, permitiendo su fusión con la membrana endosomal y la liberación del genoma viral de ARN monocatenario negativo (ssRNA⁻) en el citoplasma. Allí, la ARN polimerasa viral transcribe el genoma en ARN mensajeros individuales que codifican las proteínas virales estructurales y no estructurales. Posteriormente, se

sintetizan nuevas copias del genoma viral que, recubiertas por la nucleoproteína (N), se ensamblan en nucleocápsides. Estas se dirigen a regiones específicas de la membrana plasmática enriquecidas con proteína G, donde se ensamblan las partículas virales completas y se liberan por gemación hacia el exterior celular, completando el ciclo replicativo.

El SVCV es particularmente relevante en la acuicultura, ya que su propagación es rápida y provoca alta mortalidad, especialmente en primavera, cuando la temperatura del agua se encuentra en el rango de 10-17°C, lo que favorece la replicación del virus. Los peces infectados pueden presentar signos clínicos como hemorragias cutáneas, exoftalmia (ojos saltones), abdomen distendido por acumulación de líquido (ascitis), letargia, pérdida de equilibrio y necrosis en órganos internos como el hígado y el bazo. Estas manifestaciones, visibles tanto externamente como en cortes histológicos, son indicativas de la gravedad del cuadro clínico y justifican la inclusión de imágenes diagnósticas en los estudios de esta patología (Faheem et al., 2021).



Figura 3. Carpa infectada con SVCV, con visibles hemorragias abdominales y el exoftalmos. Fuente: Pyecroft et al. (2022)

En peces adultos, las infecciones por SVCV pueden cursar de forma subclínica, dificultando su detección y favoreciendo la persistencia del virus en las poblaciones. La transmisión ocurre mayoritariamente por vía horizontal, a través del agua contaminada, el contacto directo con individuos infectados o a través de invertebrados vectores como ciertos ectoparásitos acuáticos. También se han planteado posibles vías de transmisión vertical, aunque estas no están completamente confirmadas (Faheem et al., 2021). El contagio del virus se produce principalmente a través de las branquias, desde donde se replica y disemina hacia órganos internos como el riñón, hígado, bazo, corazón y aparato digestivo (Shen et al., 2017). Actualmente no existe una vacuna aprobada y disponible comercialmente frente a SVCV, aunque se han desarrollado formulaciones experimentales, incluyendo vacunas de ADN y virus inactivado, que han mostrado eficacia en condiciones de laboratorio. Sin embargo, su aplicación práctica en sistemas de

producción intensiva se ve limitada, ya que métodos como la inmersión, preferidos por su viabilidad en acuicultura, aún no ofrecen protección suficiente.

1.4. Extractos de origen vegetal como tratamiento antiviral.

La presencia constante de virus en los entornos acuícolas, sumada a la escasez de tratamientos eficaces y seguros, ha impulsado la búsqueda de alternativas frente al uso tradicional de antivirales sintéticos. Muchos virus acuáticos, especialmente los que contienen ARN, presentan tasas de mutación muy elevadas. Esto supone un reto importante, ya que los tratamientos convencionales suelen actuar sobre blancos moleculares específicos, lo que favorece la aparición de resistencias (Carbone et al., 2021). En este escenario, los extractos naturales derivados de plantas, hongos, microalgas y macroalgas están ganando atención como fuentes potenciales de compuestos con propiedades antivirales. Estos productos suelen tener una composición compleja, capaz de actuar en varias etapas del ciclo del virus; como su adhesión, entrada en la célula o replicación, dificultando así que el virus desarrolle mecanismos de resistencia (Wang et al., 2024).

Además, muchos de estos compuestos no solo interfieren con la replicación viral, sino que también tienen efectos inmunomoduladores, lo cual resulta especialmente útil en el manejo de enfermedades como la viremia primaveral de la carpa (SVCV) o la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) (Shen et al., 2017).

En concreto, se han identificado varios extractos vegetales y de microalgas con efectos prometedores contra infecciones víricas en peces de cultivo. Por ejemplo, extractos de *Psoralea corylifolia* ricos en bavachina han demostrado una notable capacidad para inhibir la replicación del SVCV en estudios de laboratorio, actuando sobre fases clave del ciclo viral y fortaleciendo el sistema inmunitario del pez (Cheng et al., 2018). De manera similar, la arctigenina, un compuesto que se encuentra en plantas como *Arctium lappa*, ha sido capaz de bloquear tanto la entrada como la propagación del virus en células de carpa común, además de estimular la expresión de genes involucrados en la defensa antiviral (Shen et al., 2017). Estas estrategias basadas en compuestos naturales no solo ayudan a prevenir enfermedades, sino que también permiten reducir el uso de fármacos sintéticos, favoreciendo una acuicultura más sostenible.

Las algas, tanto las microalgas unicelulares como las macroalgas, ofrecen un recurso sostenible y versátil en la búsqueda de nuevas soluciones para la salud acuícola. Su diversidad biológica y metabólica, combinada con su rápido crecimiento y bajos

requerimientos ambientales, las convierte en organismos ideales para el cultivo a gran escala (Carbone et al., 2021). Entre sus compuestos más interesantes destacan los polisacáridos sulfatados (como carragenanos y fucoidanos), las lectinas, carotenoides, compuestos fenólicos y glicoproteínas, muchos de los cuales han demostrado capacidades antivirales e inmunoestimulantes en diversas especies acuáticas (Reynolds et al., 2021).

En moluscos como *Crassostrea gigas*, ciertos compuestos derivados de microalgas han aumentado la supervivencia frente a virus, al activar mecanismos inmunitarios como la producción de sustancias antimicrobianas y la actividad hemocitaria. En crustáceos como *Litopenaeus vannamei*, el uso de extractos de algas como *Ulva* y *Sargassum* ha demostrado beneficios al mejorar la actividad de enzimas antioxidantes y potenciar la expresión de genes relacionados con la inmunidad innata (Reynolds et al., 2021).

En el caso de los peces, los extractos de algas han demostrado efectos tanto antivirales directos —inhibiendo la entrada y replicación de los virus— como inmunomoduladores, promoviendo respuestas inmunes inespecíficas como una mayor fagocitosis, la activación del sistema del complemento y el refuerzo de las barreras mucosas. Por ejemplo, *Porphyridium cruentum* ha mostrado la capacidad de impedir que los virus envueltos se adhieran a las células, mientras que especies como *Ulva lactuca* y *Gracilaria spp.* han sido relacionadas con una mayor estimulación del sistema inmune (Carbone et al., 2021). Aplicar estos compuestos durante las fases juveniles, cuando los peces son más vulnerables, puede ser una estrategia eficaz para reducir brotes, mejorar el crecimiento y aumentar la tasa de supervivencia. Gracias a su potencial preventivo y su bajo impacto ambiental, las algas se perfilan como ingredientes funcionales clave para el futuro de la acuicultura.

1.5. La microalga *Chlamydomonas reinhardtii*

Chlamydomonas reinhardtii es una microalga verde unicelular que ha despertado gran interés en los últimos años, sobre todo por su capacidad para producir sustancias bioactivas con potencial terapéutico y aplicaciones en biotecnología. Se trata de un organismo perteneciente al grupo de las clorofíceas, que suele encontrarse de forma natural en aguas dulces y suelos húmedos (Casper, 1985c). Su morfología es sencilla; de forma ovalada o casi esférica y con un tamaño cercano a las 10 micras. Uno de sus rasgos más característicos son sus dos flagelos en la parte anterior, que le permiten desplazarse activamente en el agua. A nivel celular, cuenta con un cloroplasto de gran tamaño con

forma de copa, donde se localizan los pirenoides (estructuras implicadas en la producción y almacenamiento de almidón), así como un estigma o mancha ocular que le permite detectar la luz y orientarse hacia ella mediante fototaxis.

Más allá de su estructura, esta microalga destaca por varias cualidades que la convierten en una opción muy atractiva para aplicaciones biotecnológicas. Tiene un crecimiento rápido, se cultiva con relativa facilidad en laboratorio y medios artificiales, permite manipulación genética y su cultivo tiene un impacto ambiental mínimo (Reynolds et al., 2021). Por estas razones, ha empezado a explorarse su uso en acuicultura, no solo por su valor nutricional, sino también por los compuestos secundarios que produce, muchos de los cuales presentan actividad antiviral. En particular, se han identificado polisacáridos sulfatados, carotenoides y glicoproteínas con efectos inmunoestimulantes y capacidad para inhibir la replicación de ciertos virus (Carbone et al., 2021).

Otra ventaja interesante es su capacidad para funcionar como plataforma de producción de proteínas recombinantes. Gracias a ello, puede ser utilizada para generar antígenos virales o moléculas con funciones inmunológicas, ampliando así su campo de aplicación terapéutica. Este enfoque abre la puerta a posibles tratamientos alternativos frente a enfermedades víricas en peces de cultivo. Aunque su uso directo en acuicultura aún está en fase de investigación, los resultados obtenidos hasta ahora son prometedores. Se ha propuesto su aplicación en la prevención o control de patologías como la septicemia hemorrágica viral (VHSV) o la viremia primaveral de la carpa (SVCV), que continúan siendo amenazas importantes para la producción acuícola (World Organisation for Animal Health, 2025).

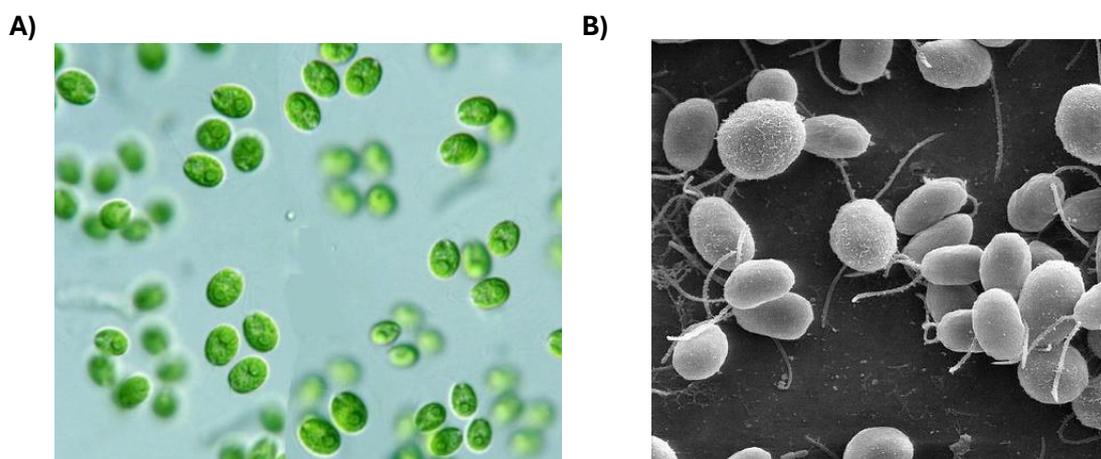


Figura 4. Morfología de *Chlamydomonas reinhardtii* **A)** Microscopía óptica. Fuente: Casper (1985c). **B)** Microscopía electrónica de barrido. Fuente: Ramakrishnan et al., (2014).

La microalga *Chlamydomonas reinhardtii* se perfila como una alternativa innovadora en el desarrollo de compuestos con propiedades antivirales. Uno de los enfoques más destacados en este campo es su uso como plataforma para la producción de proteínas terapéuticas, que pueden ser incorporadas directamente en la alimentación de los peces sin comprometer su salud intestinal ni provocar impactos negativos en el medio acuático (Carbone et al., 2021). Gracias a su facilidad de cultivo y a su compatibilidad con dietas funcionales, esta microalga abre nuevas posibilidades para diseñar estrategias profilácticas sostenibles frente a infecciones virales relevantes en acuicultura, como las causadas por el IHNV o el SVCV.

Un ejemplo ilustrativo de este enfoque es su aplicación en el desarrollo de vacunas orales contra el alfavirus de los salmónidos (SAV). En estos casos, la proteína recombinante se produce directamente en *Chlamydomonas* y se incorpora a la dieta tras un proceso de secado por aspersión (“spray drying”), técnica que permite conservar tanto su estabilidad como su eficacia funcional (Vilatte et al., 2023). Este tipo de soluciones representan un paso importante hacia la implementación de herramientas preventivas más eficientes y respetuosas con el entorno acuático.

2. Antecedentes

En un TFG anterior (Sarabia, 2024) se estudiaron cuáles de los extractos de siete especies de algas tenían actividad antiviral frente a los rhabdovirus SVCV, IHNV y VHSV. Aquellos extractos se hicieron como solvente dimetilsulfóxido (DMSO). En este trabajo nos hemos centrado en evaluar la actividad antiviral de extractos metanólicos y acuosos de tres algas verdes (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris* y *Dunaliella salina*) frente al virus SVCV.

3. Objetivos

- Determinación de la actividad antiviral de los extractos de *Chlamydomonas* frente al virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV).
- Comparación de la eficacia de la actividad antiviral entre extractos metanólicos y acuosos de *Chlamydomonas*.
- Dilucidar el posible mecanismo de acción de los extractos de algas frente a la infección por rhabdovirus: mediante tratamiento anterior a la infección, durante la entrada del virus o durante la infección.

4. Materiales y métodos.

4.1. Algas utilizadas en este trabajo.

Los extractos de algas verdes 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), *Chlorella vulgaris* por el centro tecnológico AINIA (Valencia) a través de una colaboración con los agentes de innovación del IDIBE en febrero de 2023, y *Dunaliella salina* fue facilitada por Luis Bernabeu (Sal Coloma, Alicante). Todos los extractos fueron cedidos como preparados liofilizados.

4.2. Línea celular EPC y virus SVCV.

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 cm² en medio RPMI 10% a una temperatura de 21°C.

En este trabajo se usó el virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV), concretamente la cepa FIJAN. Las infecciones con SVCV se realizaron en medio RPMI 2% a 21°C.

4.3. Preparación de extractos.

4.3.1. 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 pasaron por sonicador 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.

4.3.2. 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, pasó por sonicador 10s y se centrifugó a 3000rpm durante 5 minutos, se recogieron los sobrenadantes y fueron utilizados en los experimentos.

4.4. Preparación de tinciones

La preparación de la solución de Giemsa consiste en disolver 1 gramo 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 asegurar que no queden partículas no disueltas. Después de este tiempo, se filtra la solución con un filtro fino (de 0.45 μm) para eliminar cualquier impureza. La solución resultante se debe almacenar en un frasco oscuro o de vidrio opaco para protegerla de la luz, que puede degradar el tinte.

La preparación de la solución de tinción con cristal violeta consiste en disolver 0.1 g 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.

4.5. Ensayos de actividad antiviral.

4.5.1. Ensayo de actividad antiviral durante la entrada del virus.

Se realiza en placa 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 μL por pocillo de la solución de virus con extracto y se incuba 1h a 21°C para SVCV. 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 absorbancia a 570nm en un espectrofotómetro Eon Biotek (BioTek Instruments, Inc., VT, USA).

4.5.2. 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 100 μL por pocillo de la solución de

extracto y se incubaba 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 SVCV (Multiplicity of Infection (moi) = 0.02 virus/célula) en medio RPMI 2%. Se incubaba a 21°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 absorbancia a 570nm en un espectrofotómetro Eon Biotek (BioTek Instruments, Inc., VT, USA).

4.6. 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.

4.7. Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa GraphPad Prism 8, 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.

4.8. 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 real) 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 5min 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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que permite calcular la expresión relativa tomando como referencia un gen estable, en nuestro caso eF1a.

En este trabajo, se analizó la expresión de genes relacionados con la respuesta antiviral, incluyendo el gen N del virus SVCV, así como los genes *ifn* (interferón) y *mx* (“myxovirus-resistance”) 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
<i>ef1a</i>	CTGGAGGCCAGCTCAAACAT	CATTCCCTCCTTACGCTCAAC
<i>svc-v-n</i>	GCATTATGCCGCTCCAAGAG	AGCTTGCATTTGAGATCGA
<i>mx</i>	GGAGAAGAGGTTAAATGTGGATCAG	TGACCGAATCAAGAAGTCATTCC
<i>ifn</i>	ACAGGCAGTCGTCGGA ACTTA	TGAAGTGCCTTTTTATCTTAATCTCGT

5. Resultados.

5.1. Toxicidad de los extractos.

5.1.1. Toxicidad del extracto metanólico

A lo largo de este trabajo se utilizaron dos extractos de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, en metanol y en agua. Antes de evaluar el efecto antiviral de dichos extractos, se consideró fundamental analizar su posible toxicidad sobre las células EPC. Para ello, se realizó un ensayo con los extractos metanólicos y acuosos con el fin de determinar si afectaban negativamente a la viabilidad celular. Además, se incluyó un ensayo específico para comprobar si el metanol presente como disolvente podía tener un efecto citotóxico por sí solo. Estos análisis permitieron establecer las concentraciones seguras a utilizar en los experimentos posteriores.

En primer lugar, se estudió el efecto del metanol por ensayo de supervivencia celular para determinar su toxicidad sobre la línea celular EPC.

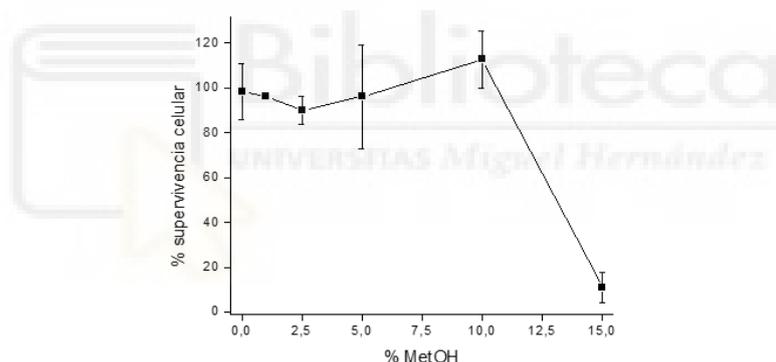


Figura 5. Evaluación de la toxicidad del metanol a concentraciones de 1, 2.5, 5, 10 y 15% en células EPC. Las células se fijaron con metanol a los 2 días de tratamiento, se tiñeron con Giemsa y se midió la absorbancia a 570 nm. Cada punto representa el promedio de un triplicado con su desviación estándar, siendo la media del triplicado del control sin tratamiento el 100% de supervivencia celular.

Hasta una concentración de metanol del 10% no se apreció ninguna disminución de la supervivencia celular (Figura 5). A una concentración del 15% resultó altamente tóxico para las células.

Adicionalmente se estudió el efecto de los extractos metanólicos y acuosos de la microalga *Chlamydomonas* por ensayo de supervivencia celular para determinar su toxicidad sobre la línea celular EPC.

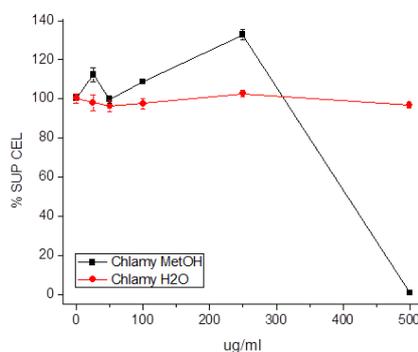


Figura 6. Evaluación de la toxicidad de extractos de *Chlamydomonas* en metanol:agua (80:20) y en agua a concentraciones de 25, 50, 100, 250 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en células EPC. Las células se fijaron con metanol a los 4 días de tratamiento, se tiñeron con Giemsa, y se midió la absorbancia a 570 nm. Cada valor representa el promedio de un triplicado con su desviación estándar, siendo la media del triplicado del control sin tratamiento el 100% de supervivencia celular.

La supervivencia de las células EPC incubadas con el extracto acuoso se mantuvo constante a concentraciones crecientes, sin resultar tóxico ni causar descensos significativos en la supervivencia incluso a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 6). Por el contrario, el extracto metanólico resultó tóxico a la concentración máxima ensayada de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, provocando una muerte celular cercana al 100%.

5.2. Actividad mediante pretratamiento.

Para comprobar el efecto del extracto se recurrió a ensayos 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 no tratado.

Se estudiaron los efectos del extracto metanólico de *Chlamydomonas* llevando a cabo un tratamiento previo a la infección en células EPC, con el objetivo de determinar su toxicidad y la capacidad de proteger a las células frente a la infección con SVCV, realizando una curva dosis/respuesta (Figura 7). Para ello, se trataron las células con concentraciones crecientes de los extractos de algas durante 18h, tras las cuales se realizó la infección con SVCV.

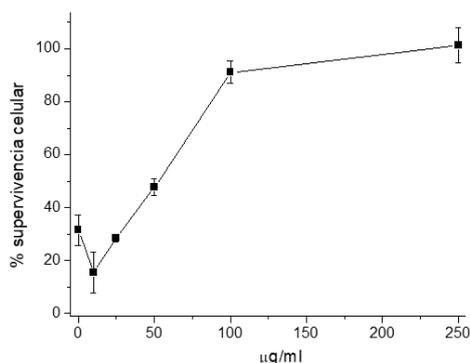


Figura 7. Evaluación de la toxicidad y el efecto sobre la infección con SVCV (moi=0.02 virus/célula) de extractos en metanol:agua (80:20) de *Chlamydomonas* en células EPC durante las 18 horas anteriores a la infección con el virus. Se representa la relación dosis-respuesta frente a la infección con SVCV. Las células se fijaron con metanol a los 2 días post-infección (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.

Se observó que, a una concentración de 100 µg/mL de extracto, la supervivencia celular superaba el 90%. Además, se evidenció que, a mayor concentración del extracto, mayor fue la capacidad de protección, incrementándose progresivamente el porcentaje de células viables.

A continuación, se llevó a cabo otro ensayo de supervivencia celular mediante un tratamiento previo a la infección, pero esta vez incorporando un extracto metanólico del alga verde *Chlorella*, para comparar sus efectos con el de *Chlamydomonas*.

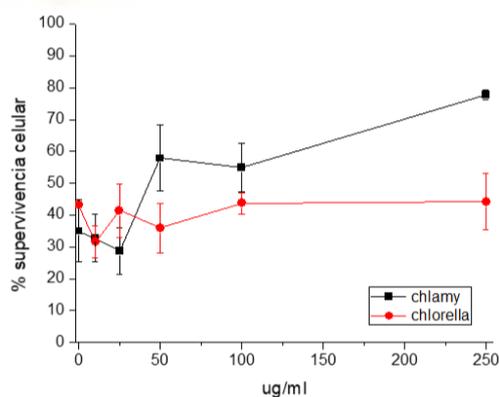


Figura 8. Evaluación del efecto de extractos en metanol:agua (80:20) de *Chlamydomonas* y *Chlorella* a concentraciones de 10, 25, 50, 200 y 250 µg/mL frente a la infección por SVCV (moi=0.02 virus/célula) en células EPC con un pretratamiento de 2 horas previo a la infección. Las células se fijaron y tiñeron con cristal violeta a los 3 dpi 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 del ensayo indicaron que el extracto de *Chlamydomonas* presentaba el mayor efecto protector, aumentando la supervivencia celular hasta aproximadamente un 80 % (Figura 8). En comparación, el extracto de *Chlorella* no mostró capacidad apreciable de inhibir el efecto citopático inducido por SVCV.

En los siguientes experimentos se comprobó la eficacia de los extractos acuosos de *Chlamydomonas* frente al virus SVCV, comparando su efecto con el de los extractos metanólicos.

En primer lugar, se evaluaron ambos tipos de extractos de *Chlamydomonas* mediante un tratamiento previo a la infección de 2 horas, con el propósito de determinar su toxicidad y establecer la concentración más eficaz frente a la infección por SVCV.

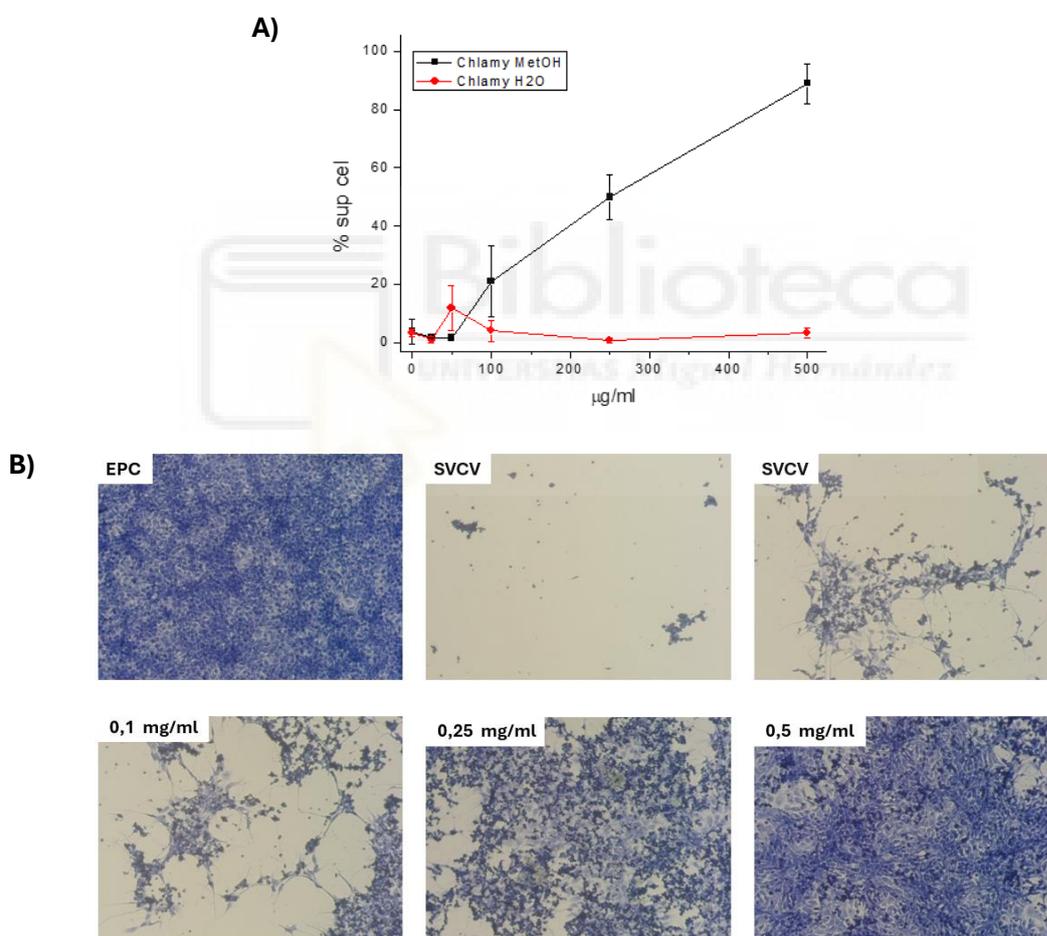


Figura 9. Evaluación del efecto de extractos de *Chlamydomonas* en metanol:agua (80:20) y en agua a concentraciones crecientes frente a la infección por SVCV ($moi=0,02$ virus/célula) en células EPC con un tratamiento de 2h previo a la infección. Las células se fijaron con metanol a los 3 dpi, se tiñeron 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. (A) Porcentaje de supervivencia celular en función de la concentración del extracto. (B) Imágenes de las células tratadas con el extracto metanólico, teñidas con Giemsa y observadas al microscopio Nikon Eclipse TE2000-U a 200x.

En este caso, los extractos metanólicos mostraron una mayor protección frente a la infección viral conforme se incrementaba su concentración (Figura 9 (A)), de acuerdo con los experimentos anteriores. Sin embargo, los extractos acuosos no lograron aumentar la supervivencia celular.

Para comprobar visualmente estos resultados se tomaron imágenes de microscopía para observar en detalle el efecto citopático causado por el virus (Figura 9 (B)). A partir de estas imágenes se aprecia claramente la muerte celular que provoca el SVCV, así como la protección que proporciona el extracto metanólico de *Chlamydomonas*, ya que prácticamente no se observa efecto citopático en su máxima concentración, lo que se correlaciona con los datos de supervivencia celular.

A continuación, se realizó otro ensayo de supervivencia celular, esta vez con un pretratamiento más largo de 24h, centrándonos en el extracto acuoso de *Chlamydomonas*.

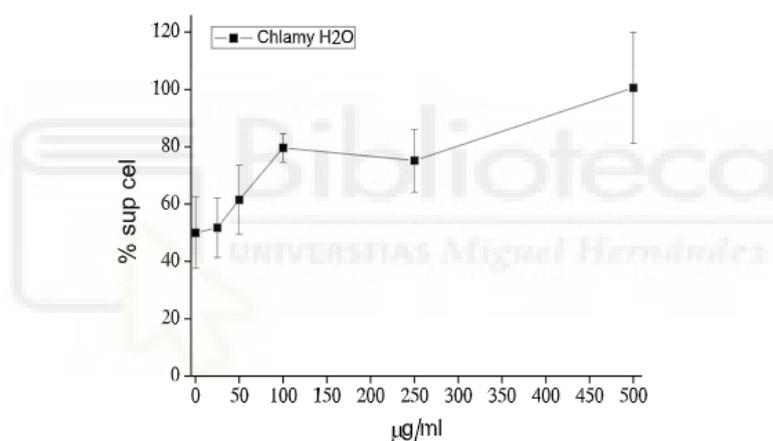


Figura 10. Evaluación del efecto del extracto acuoso de *Chlamydomonas* a concentraciones de 25, 50, 100, 250 y 500 µg/mL frente a la infección por SVCV (moi=0,02 virus/célula) en células EPC con un tratamiento de 24h previo a la infección. Las células se fijaron con metanol a los 4 dpi, se tiñeron con 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.

El extracto acuoso promovió un aumento significativo en la supervivencia celular, mostrando un efecto protector a partir de una concentración de 100 µg/mL, tal como se observa en la Figura 10.

5.3. Actividad durante la entrada del virus.

Paralelamente, se realizaron ensayos de supervivencia celular para determinar la toxicidad y efectividad de extractos metanólicos y acuosos de *Chlamydomonas* frente a la infección con SVCV, en este caso durante la entrada. Para ello los extractos con el virus se

ponen en contacto con las células durante la primera hora y media de infección, tiempo en el que se considera que se produce la entrada del virus a las células. Posteriormente se retiran y la infección prosigue en medio de cultivo normal.

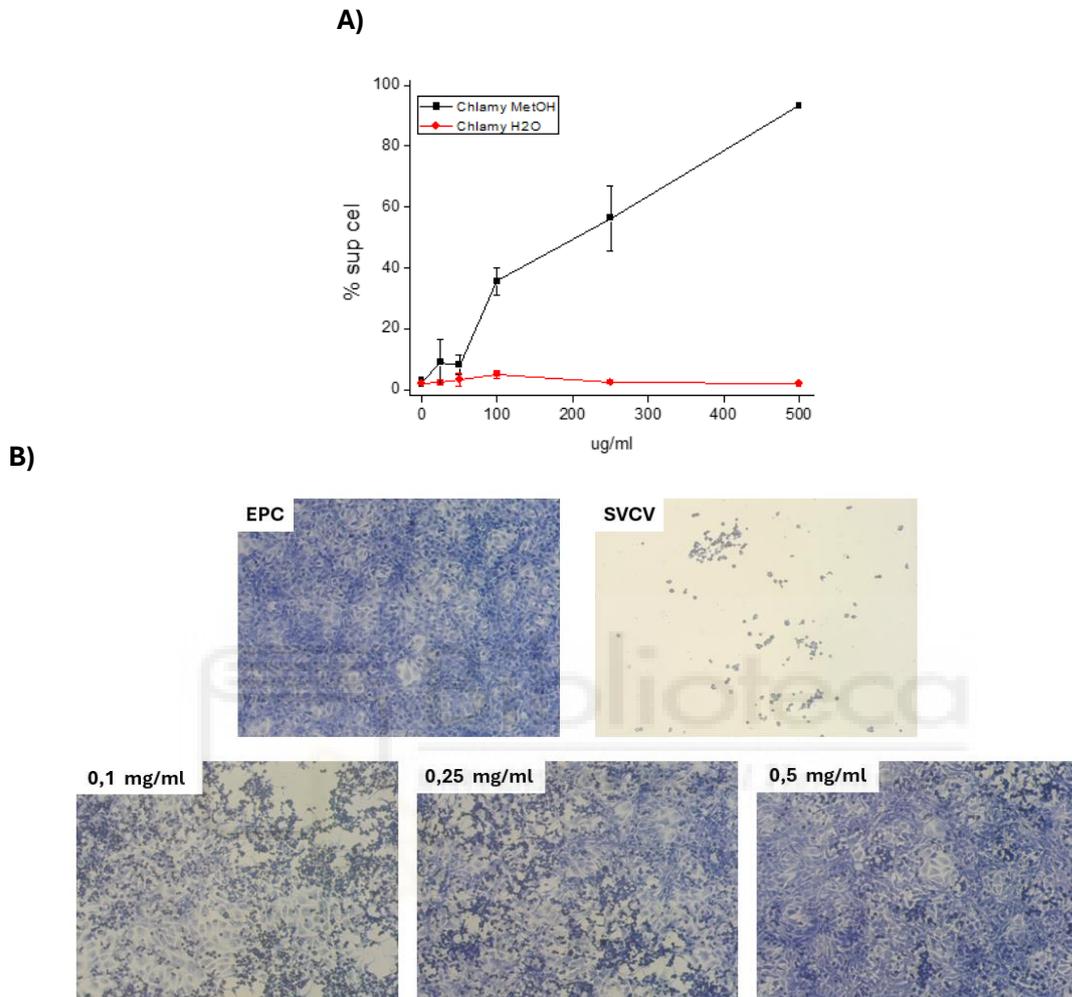


Figura 11. Evaluación del efecto de extractos de *Chlamydomonas* en metanol:agua (80:20) y acuoso a concentraciones crecientes frente a la infección por SVCV (moi=0,02 virus/célula) en células EPC durante la entrada del virus. Las células se fijaron con metanol a los 3 dpi, se tiñeron con Giemsa, y se 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. (A) Porcentaje de supervivencia celular en función de la concentración del extracto. (B) Imagen de las células tratadas con el extracto metanólico, teñidas con Giemsa y observadas al microscopio Nikon Eclipse TE2000-U a 200x.

Los resultados (Figura 11 (A)) reflejan que los extractos acuosos de *Chlamydomonas* no aumentan el porcentaje de supervivencia celular. En cambio, se observa un incremento en la supervivencia celular de células tratadas con extracto metanólico de *Chlamydomonas* frente al control infectado. Dicho efecto protector queda corroborado con las imágenes del microscopio óptico (Figura 11 (B)).

5.4. Actividad durante la infección.

Además de evaluar el efecto protector de los extractos, es fundamental analizar su actividad durante la fase activa de la infección viral. Este apartado se centra en determinar si los compuestos son capaces de ejercer un efecto protector cuando están presentes después de la entrada del virus durante las etapas iniciales de la replicación del virus ya en el interior de la célula. Esta información es clave para comprender los posibles mecanismos de acción antivirales.

Para evaluar la eficacia antiviral del extracto metanólico de *Chlamydomonas*, se analizó su efecto sobre la expresión del gen *svcv-n*, por ser el mensajero viral más abundante en las células infectadas con SVCV. Se empleó una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) para cuantificar el RNA viral a las 24 horas post-infección (hpi), comparando el efecto del extracto tras un pretratamiento de 24 h y durante la infección.

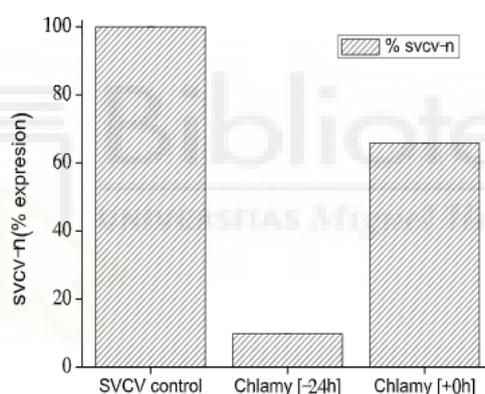


Figura 12. Expresión relativa del gen *svcv-n* en células EPC infectadas con SVCV ($\text{moi} = 0,02$ virus/célula) y tratadas con extracto metanólico de *Chlamydomonas* ($0,1 \text{ mg/mL}$) en dos condiciones experimentales; 24 horas antes de la infección y en el momento de la infección. La expresión génica se evaluó mediante qPCR a las 24 hpi. Las células se fijaron con metanol a los 3 dpi, se tiñeron con Giemsa, y se midió la absorbancia a 570 nm. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control infectado no tratado, que se considera el 100 % de expresión.

En este ensayo se observó que el tratamiento más eficaz fue el de las 24h previas a la infección, el cual redujo la expresión del gen viral *svcv-n*, con un descenso de aproximadamente el 90 % respecto al control (Figura 12). En cambio, la aplicación del extracto únicamente durante la infección produjo una expresión del gen viral cercana al 65 %.

Con el objetivo de caracterizar la progresión temporal de la infección por SVCV en células EPC y evaluar el efecto del extracto de *Chlamydomonas* durante el curso de la infección, se realizó una cinética de viabilidad celular. Las mediciones se llevaron a cabo en distintos días post-infección; 0, 1, 4 y 7, comparando células infectadas solo con SVCV frente a células infectadas con SVCV y en presencia del extracto.

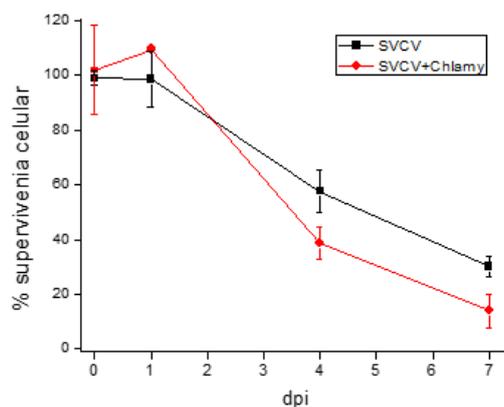


Figura 13. Cinética de viabilidad celular tras la infección con SVCV (moi=0.02 virus/célula) en células EPC, con y sin tratamiento con extracto de *Chlamydomonas* (0,1 mg/mL). La viabilidad celular se midió a 0, 1, 4 y 7 dpi, las células se fijaron y tiñeron con cristal violeta y lectura de absorbancia 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 una disminución progresiva en la supervivencia celular a lo largo del tiempo en ambos grupos, lo que refleja el avance de la infección en el cultivo celular. En el grupo infectado únicamente con SVCV, la viabilidad celular disminuye de forma gradual, alcanzando aproximadamente un 30 % a los 7 dpi. En el grupo tratado con SVCV y el extracto de *Chlamydomonas*, la tendencia es similar, aunque con una ligera reducción adicional de la supervivencia a partir del día 4, llegando a menos del 20 % al final del experimento (Figura 13). Esta ligera reducción podría deberse a una leve toxicidad del extracto tras una exposición prolongada, no apreciable en las primeras 24 horas, pero visible a partir de los 4 días de tratamiento.

5.5. 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 frente a la infección por SVCV, considerando un intervalo de 3 días entre el tratamiento y la exposición viral. 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.

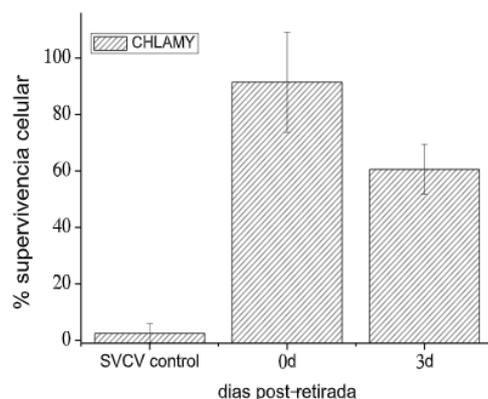


Figura 14. Evaluación del efecto de extractos en metanol:agua (80:20) de *Chlamydomonas* (0,1 mg/mL) frente a la infección por SVCV (MOI = 0,02 virus/célula) en células EPC, tras un pretratamiento de 20 h. El virus se añadió 3 días después de retirar el tratamiento (20 h). Las células se fijaron con metanol a los 3 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 cuando la infección con el virus se lleva a cabo justo después del pretratamiento con extracto, induce un efecto protector más potente, con niveles de supervivencia celular cercanos al 100 %. En cambio, cuando la infección ocurre 3 días después de haber retirado el tratamiento, la protección disminuye considerablemente, alcanzando una supervivencia aproximada del 60 %, como se observa en la Figura 14.

5.6. Estimulación de genes de respuesta inmunitaria.

Dado que se ha observado que los extractos de *Chlamydomonas* son más efectivos mediante pretratamiento, es posible que se deba a la estimulación de la respuesta inmune. Para analizar si dichos extractos ejercen un efecto inmunoestimulante en las células, se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR cuantitativa enfocados a evaluar la expresión de genes implicados en la respuesta inmunitaria innata frente a infecciones virales. Estos estudios permiten determinar si los extractos activan rutas celulares asociadas a la defensa antiviral, proporcionando una visión más completa de su posible mecanismo de acción.

Se evaluaron los niveles de expresión del interferón tipo I y del gen *mx*, un marcador clásico cuya activación depende directamente de esta vía, en células EPC tratadas con el extracto metanólico de *Chlamydomonas*. Para ello, se emplearon ensayos de RT-PCR

cuantitativa que permiten detectar la activación de rutas celulares implicadas en la defensa antiviral.

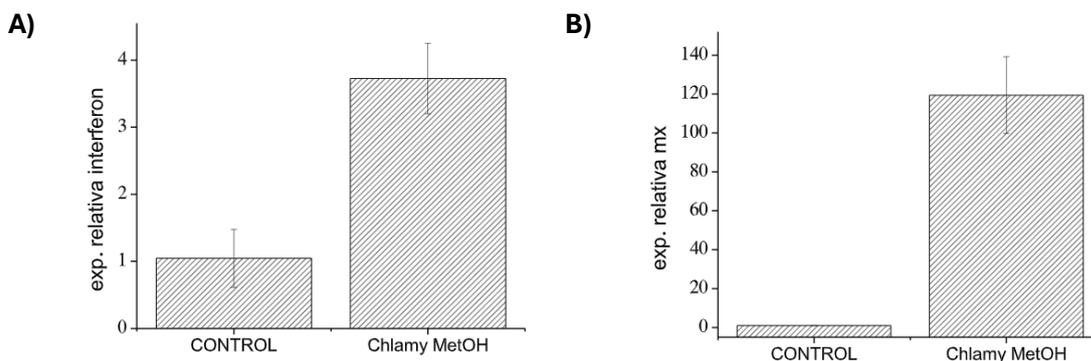


Figura 15. Expresión relativa de genes de respuesta inmunitaria en células EPC tratadas con extracto metanólico de *Chlamydomonas* (100 µg/mL). La expresión génica se cuantificó mediante RT-PCR tras 24 horas de tratamiento, sin infección viral. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar, normalizados respecto al control no tratado. A) Expresión relativa del gen interferón. B) Expresión relativa del gen *mx*.

Los análisis realizados evidencian una activación destacada de genes relacionados con la respuesta inmune tras el tratamiento con el extracto metanólico de *Chlamydomonas reinhardtii*. En particular, se detectó un incremento aproximado de 3,8 veces en la expresión del gen interferón en comparación con el control (Figura 15 (A)). Por su parte, la expresión del gen *mx* mostró un aumento aún más marcado, alcanzando niveles considerablemente elevados (Figura 15 (B)). Estos datos sugieren que dicho extracto es capaz de activar la vía del interferón en células EPC.

Para confirmar si esta activación se traduce en una protección funcional frente a infecciones virales, se llevó a cabo un ensayo de supervivencia celular tras el pretratamiento con extractos metanólico y acuoso, seguido de la exposición al SVCV. Como referencia positiva se empleó poly I:C (20 microgramos/ml), un análogo sintético de ARN de doble cadena ampliamente utilizado por su capacidad para inducir respuestas antivirales robustas a través de la estimulación de interferones y otros genes inmunitarios. Este control permitió establecer una comparación en términos de protección celular asociada a la activación de mecanismos inmunes innatos.

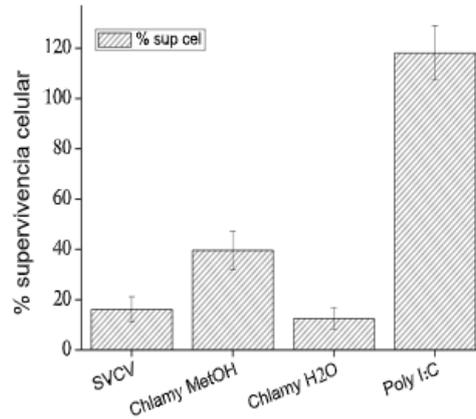


Figura 16. Evaluación del efecto de los extractos metanólico y acuoso de *Chlamydomonas* a 100 µg/mL de concentración frente a la infección por SVCV (moi=0,02 virus/célula) en células EPC. Cada valor representa el promedio de un triplicado con su desviación estándar. La primera columna se corresponde con un control positivo de SVCV, la segunda con el extracto metanólico de *Chlamydomonas*, la tercera con el acuoso y la cuarta con el Poly I:C (poliribonucleótido de inosina y citidina).

El tratamiento con el extracto metanólico aumentó la supervivencia hasta aproximadamente un 40 % respecto al control infectado con SVCV, mientras que el extracto acuoso no mostró una mejora significativa respecto al control viral. Como referencia, el tratamiento con poly I:C indujo una protección completa de las células, lo que confirma su eficacia como inductor de la respuesta antiviral (Figura 16).

5.7. Comparación de la actividad antiviral de extracto de *Chlamydomonas* con la de un extracto de *Dunaliella salina*

Con el fin de comparar el potencial antiviral del extracto de *Chlamydomonas* con el de otra especie de microalga verde, se evaluó la capacidad protectora de extractos metanólicos y acuosos de *Chlamydomonas* y *Dunaliella* frente a la infección por SVCV en células EPC. Para ello, se realizaron tratamientos con los extractos en dos condiciones experimentales: un pretratamiento de 24 horas antes de la infección y otro durante la entrada del virus. Se analizó la supervivencia celular como medida indirecta de la protección conferida por cada extracto.

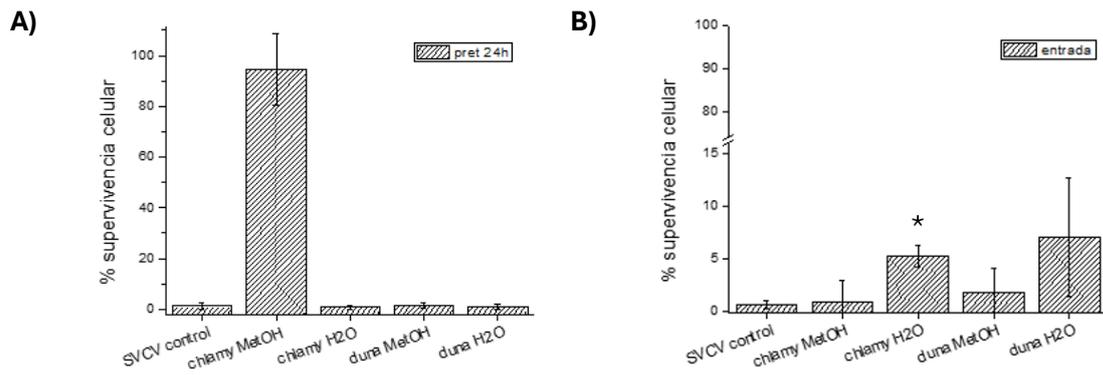


Figura 17. Porcentaje de supervivencia celular en células EPC tratadas con extractos metanólicos y acuosos de *Chlamydomonas* y *Dunaliella* frente a la infección por SVCV (moi = 0,02 virus/célula). Las células se fijaron con metanol a los 3 dpi, se tiñeron con Giemsa y se midió absorbancia a 570nm. 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) Las células fueron tratadas con los extractos durante 24 horas antes de la infección. B) Tratamiento durante la entrada viral: los extractos se mantuvieron durante los 90 minutos de entrada del virus.

Los resultados muestran que el extracto metanólico de *Chlamydomonas* es el único tratamiento que confiere una protección significativa frente a SVCV en condiciones de pretratamiento, alcanzando una supervivencia celular cercana al 100% (Figura 17 (A)). En contraste, ni los extractos metanólico ni acuoso de *Dunaliella*, ni el extracto acuoso de *Chlamydomonas*, lograron mejorar la supervivencia celular frente a la infección viral en esta condición.

Durante la entrada, ninguno de los tratamientos logró inducir una protección notable frente a la infección (Figura 17 (B)). No obstante, sólo el extracto acuoso de *Chlamydomonas* dio lugar a un ligero aumento, si bien significativo, de la supervivencia, pero sin llegar a alcanzar el 100%.

Estos resultados sugieren que la capacidad de inhibir la infección por SVCV podría ser una característica específica del extracto de *Chlamydomonas*, y que los extractos de otras algas no necesariamente poseen actividad antiviral.

6. Discusión.

Partiendo de trabajos previos en los que se demostró actividad antiviral de extractos de algas preparados con DMSO (Sarabia Ibarra, 2024), este estudio se propuso ampliar dicha línea de investigación evaluando extractos metanólicos y acuosos de *Chlamydomonas reinhardtii*, con el fin de explorar nuevas posibilidades terapéuticas frente a infecciones virales en peces.

Las infecciones virales representan uno de los principales desafíos sanitarios en acuicultura, especialmente en sistemas de cultivo intensivo, donde las condiciones favorecen la propagación de patógenos. Entre los virus más perjudiciales se encuentran los rhabdovirus, como el virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV), que afecta especialmente a especies ciprínidas. A pesar de los avances en investigación, las opciones terapéuticas disponibles en el mercado siguen siendo limitadas (Pan et al., 2024). Además, la elevada tasa de mutación de muchos virus de ARN dificulta la eficacia sostenida de los tratamientos antivirales, favoreciendo la aparición de resistencias.

En este contexto, ha cobrado fuerza el interés por compuestos naturales, particularmente aquellos derivados de plantas y algas, como posibles agentes antivirales seguros y sostenibles. Diversas investigaciones han demostrado que metabolitos como la umbeliferona (Mendis et al., 2024), la epicatequina (Huang et al., 2025) o la arctigenina (Hu et al., 2025b) pueden inhibir la replicación viral, bloquear la entrada del virus a las células huésped o modular la respuesta inmune. Del mismo modo, polisacáridos extraídos de algas pardas del género *Sargassum* han mostrado un notable efecto antiviral (Panwong et al., 2024), y su uso combinado con vacunas podría mejorar la eficacia frente a virus como el IHNV (Pan et al., 2024). Estos hallazgos refuerzan la idea de que los compuestos naturales pueden jugar un papel relevante en el diseño de nuevas estrategias antivirales para el sector acuícola.

El estudio de estos compuestos comienza habitualmente con ensayos in vitro sobre líneas celulares susceptibles a infección, donde el pretratamiento con extractos naturales permite evaluar su capacidad para interferir en fases tempranas del ciclo viral. En el caso de la umbeliferona, por ejemplo, se ha demostrado que reduce significativamente la infección por VHSV en células EPC al interferir en la fase de adsorción (Mendis et al., 2024). De forma similar, extractos metanólicos de *Sargassum spp* inhibieron la entrada del virus del dengue en células Vero cuando se aplicaron antes de la infección (Panwong et al., 2024). Este tipo de efectos también se ha observado en modelos acuáticos, como en el

caso del derivado de arctigenina COA, que aplicado antes de la exposición al IHNV impidió su adhesión a las células CHSE-214 sin activar respuestas inmunes específicas, actuando probablemente como una barrera competitiva en la superficie celular (Hu et al., 2025b).

Bloquear la entrada del virus constituye una estrategia clave para frenar el inicio de la infección. En este sentido, se ha observado que la forma de extracción del compuesto influye notablemente en su eficacia antiviral. Por ejemplo, extractos acuosos de *Sargassum* resultaron más efectivos que los metanólicos para prevenir la infección por dengue, probablemente por una mayor concentración de compuestos hidrosolubles activos (Panwong et al., 2024). La umbeliferona, aplicada directamente durante la infección, también mostró capacidad para interferir en la interacción virus-célula. En el caso del derivado COA de arctigenina, su acción específica en la fase de adsorción del virus a la célula refuerza el potencial de los compuestos que actúan sobre las etapas iniciales del ciclo viral (Hu et al., 2025b).

Más allá de los estudios celulares, algunos de estos compuestos han demostrado eficacia en modelos animales. Por ejemplo, la epicatequina, un flavonoide presente en el té verde, mostró actividad inhibitoria frente al virus de mero (SGIV), tanto en cultivos celulares como en peces alimentados con dietas suplementadas con el compuesto (Huang et al., 2025). Asimismo, un polisacárido extraído de *Astragalus* administrado en combinación con una vacuna inactivada contra el IHNV en trucha arcoíris generó una respuesta protectora eficaz (Pan et al., 2024). Estos ejemplos demuestran no solo la actividad antiviral, sino también la buena tolerancia de estos compuestos en peces, aspecto clave para su aplicación práctica en acuicultura.

Un ejemplo interesante de cómo estos extractos pueden funcionar también en condiciones reales lo ofrece un estudio en el que se administró por vía oral un extracto de la macroalga *Ecklonia cava* a peces platija infectados con el virus VHSV. Los resultados mostraron que los peces tratados sobrevivieron en mayor proporción que los no tratados, lo que demuestra que este tipo de compuestos puede ofrecer protección antiviral efectiva también en organismos completos, no solo en células en cultivo. Este tipo de ensayos refuerza la idea de que el uso de algas como suplemento en la dieta podría ser una estrategia viable y prometedora para prevenir infecciones víricas en acuicultura (Yang et al., 2017).

Entender los mecanismos de acción de estos extractos requiere un análisis detallado de su composición. En general, los extractos metanólicos tienden a concentrar

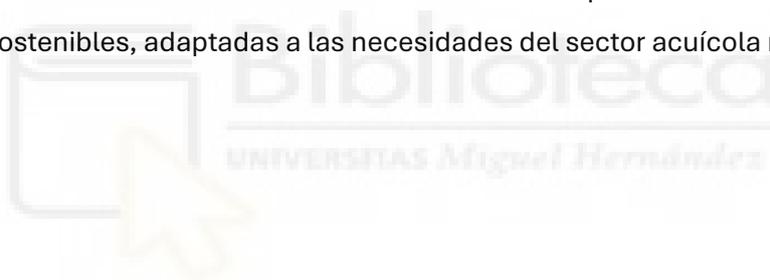
metabolitos de naturaleza lipofílica o semipolar, como flavonoides, fenoles, terpenoides y bromofenoles, conocidos por su potencial antiviral. Flavonoides extraídos de *Rhus verniciflua* han mostrado capacidad para inhibir la replicación de IHNV y VHSV (Kang et al., 2012), mientras que compuestos similares presentes en *Polysiphonia morrowii* también redujeron la infectividad del IHNV (Kim et al., 2011). Por su parte, los extractos acuosos suelen estar enriquecidos en polisacáridos con efectos sobre la adsorción viral o con propiedades inmunoestimulantes, como se ha comprobado con la fracción polisacáridica de un alga marrón, que mostró actividad inhibitoria sobre el virus de trucha IHNV (Ren, 2022). Algunos estudios recientes han identificado en *Chlamydomonas reinhardtii* extractos acuosos capaces de interferir en la replicación de un herpes de carpa tras el contacto directo con el virus (Fritzsche et al., 2021), lo que refuerza su potencial como ingrediente funcional en acuicultura (Monteiro et al., 2021).

La actividad antiviral que hemos observado en los extractos de *Chlamydomonas reinhardtii* podría explicarse por su compleja composición en compuestos bioactivos, como polisacáridos sulfatados, carotenoides, lípidos y fenoles (Fritzsche et al., 2021b). Estos extractos combinan múltiples metabolitos capaces de interferir en distintos puntos del ciclo viral, ya sea mediante una acción directa sobre el virión o interfiriendo con algún paso del ciclo de replicación del virus. Los extractos metanólicos, en particular, permiten aislar compuestos semipolares con potencial antioxidante y antimicrobiano. En estudios previos se ha demostrado que los extractos metanólicos de *Chlamydomonas* presentan capacidad antioxidante y bactericida (Olvera-Ramírez et al., 2025), propiedades que podrían también contribuir a una respuesta antiviral más eficaz al reducir el estrés oxidativo inducido por la infección (Annamalai & Nallamuthu, 2014). En los ensayos realizados, este tipo de extractos mostró una interferencia notable durante fases iniciales de la infección, apoyando su interés para futuras aplicaciones terapéuticas.

En contraste, otras microalgas como *Dunaliella* no mostraron una eficacia significativa en condiciones experimentales similares. Ni los extractos metanólicos ni los acuosos lograron mejorar la supervivencia celular frente al SVCV. Sin embargo, extractos en DMSO de *Dunaliella* sí demostraron capacidad inhibitoria frente al IHNV tras pretratamiento (Sarabia, 2024), lo que apunta a un posible efecto virucida directo. Igualmente inefectivo fue el extracto de *Chlorella*, que se ensayó por su reportada actividad frente al SARS-CoV-2 (García-Ruiz, 2022). Aunque el efecto directo sobre la partícula viral resulta interesante a nivel experimental, su aplicabilidad práctica es limitada, ya que en condiciones reales de cultivo se requieren medidas que protejan al organismo, no solo que

inactiven el virus en el entorno. Algunos estudios han descrito este tipo de efecto en extractos de algas rojas como *Polysiphonia* o análogos de clorofila c2, con capacidad para inactivar directamente el IHNV (Kamei & Aoki, 2007). También se ha documentado una acción similar en extractos de *Chlamydomonas reinhardtii* frente a CyHV-3, al incubarse previamente el extracto con el virus (Fritzsche et al., 2021). No obstante, este enfoque no fue considerado en el presente estudio, ya que se priorizaron las estrategias de inducción de un estado antiviral en las células, más relevantes en contextos productivos reales.

En conjunto, los resultados de este trabajo subrayan el potencial de los extractos de *Chlamydomonas reinhardtii* como fuente de compuestos con actividad antiviral frente a patógenos relevantes en acuicultura. La eficacia observada, especialmente en los extractos metanólicos, apunta a la presencia de metabolitos capaces de interferir en etapas tempranas del ciclo viral, lo que los convierte en candidatos prometedores para el desarrollo de herramientas preventivas. Sin embargo, dada la complejidad de estos extractos, es imprescindible avanzar en la identificación de sus componentes activos y evaluar su eficacia en modelos in vivo. Este conocimiento permitirá diseñar estrategias terapéuticas sostenibles, adaptadas a las necesidades del sector acuícola moderno.



7. Conclusiones.

En este estudio se analizó el potencial antiviral de extractos acuosos y metanólicos obtenidos de *Chlamydomonas reinhardtii* frente al virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV), empleando la línea celular EPC como modelo experimental. Adicionalmente, se realizó una comparación con extractos de *Chlorella vulgaris* y *Dunaliella salina*, con el objetivo de situar la actividad de *Chlamydomonas* en un contexto más amplio dentro de las microalgas verdes.

1.- El extracto metanólico de *Chlamydomonas* exhibe una notable capacidad para reducir el daño viral cuando se utiliza como pretratamiento, disminuyendo tanto el efecto citopático como la expresión del gen viral *svcv-n*. Esta acción podría estar relacionada con una estimulación de la respuesta inmune celular, respaldada por el incremento observado en la expresión de genes como *ifn* y *mx*. No obstante, el efecto protector mostró una duración limitada, atenuándose progresivamente tras la retirada del compuesto.

2.- El extracto acuoso de *Chlamydomonas* mostró una actividad más modesta, con cierto grado de protección únicamente tras una exposición previa prolongada, pero sin efecto apreciable durante la fase de infección.

3.- En cuanto a *Chlorella vulgaris*, su extracto metanólico presentó una actividad antiviral menos marcada en comparación con *Chlamydomonas*, sin evidenciar una protección significativa en las mismas condiciones de ensayo.

4.- En el caso de *Dunaliella salina*, los extractos evaluados, tanto acuosos como metanólicos, no mostraron efectos notables frente a la infección viral, lo que pone en valor la especificidad de *Chlamydomonas reinhardtii* como fuente de compuestos con actividad antiviral.

En conjunto, los resultados aquí mostrados respaldan el interés por seguir explorando el extracto metanólico de esta microalga como base para nuevas estrategias antivirales en el ámbito acuícola, especialmente de cara a futuras validaciones en modelos animales y posibles aplicaciones prácticas.

8. Perspectivas futuras.

A partir de los resultados observados in vitro, futuras investigaciones podrían centrarse en la identificación y caracterización de los compuestos activos presentes en los extractos de *Chlamydomonas reinhardtii* que podrían estar implicados en la actividad antiviral. Una vez aislados, estos metabolitos podrían evaluarse individualmente para determinar cuáles son los principales responsables del efecto observado. Paralelamente, sería conveniente llevar a cabo ensayos en organismos modelo como el pez cebra (cuya susceptibilidad a infección por SVCV ha sido demostrada en nuestro laboratorio), con el objetivo de validar su eficacia antiviral en condiciones in vivo y descartar posibles efectos adversos. En el marco de una posible aplicación en acuicultura, resultaría útil explorar estrategias de administración viables, como la inclusión del extracto en la dieta de los peces, lo que facilitaría su uso en contextos productivos. Asimismo, podría considerarse su aprovechamiento como suplemento funcional con propiedades inmunoestimulantes o incluso probióticas, dado que algunas microalgas han demostrado efectos positivos sobre la microbiota intestinal y el sistema inmune en peces. Finalmente, sería interesante extender la evaluación de estos extractos frente a otros virus relevantes en acuicultura de salmón y trucha, como los ya mencionados IHNV, VHSV o SAV, para determinar el alcance de su espectro antiviral.

9. Referencias.

- Annamalai, J., & Nallamuthu, T. (2014). Antioxidant potential phytochemicals from methanol extract of *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal Of Algal Biomass Utilization*. <http://jalgalbiomass.com/paper10vol5no4.pdf>
- 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>
- Casper, S. J. (1985c). H. Ettl, J. Gerloff, H. Heynig und D. Mollenhauer (Herausgeber), *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Band 9: Chlorophyta I. (Phytomonadina), Verfasser: H. Ettl. *Journal Of Basic Microbiology*, 25(3), 154. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620250303>
- Cheng, C., Yu-Feng, S., Yang, H., Lei, L., Wei-Chao, C., Gao-Xue, W., & Bin, Z. (2018). Highly efficient inhibition of spring viraemia of carp virus replication in vitro mediated by bavachin, a major constituent of *psoralea corlifonia* Lynn. *Virus Research*, 255, 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.06.002>
- Faheem, M., Azmat, H., Swar, S., Khaliq, S., & Hoseinifar, S. H. (2021). Some Important Viral Diseases of Farmed Fish. *International Journal Of Veterinary Science*, Chapter 1, 472–480. <https://doi.org/10.47278/book.vpph/2021.040>
- Fritzsche, S., Blenk, P., Christian, J., Castiglione, K., & Becker, A. M. (2021). Inhibitory properties of crude microalgal extracts on the in vitro replication of cyprinid herpesvirus 3. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02542-2>
- Garcia-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*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22148-6>
- Hu, Y., Wang, H., Wang, Z., Zhang, X., Liu, L., & Chen, J. (2025). Antiviral potential of the arctigenin derivative COA in reducing viral adhesion to the epithelial cell surface against IHNV infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 110278. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2025.110278>
- Huang, L., Kuang, J., Yu, J., Yu, Q., Xu, W., Liu, M., Wei, Y., Han, S., Huang, Y., & Li, P. (2025). Antiviral activity of epicatechin against Singapore grouper iridovirus in vitro and in vivo. *Fish & Shellfish Immunology*, 110331. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2025.110331>
- Kamei, Y., & Aoki, M. (2007). A chlorophyll c2 analogue from the marine brown alga *Eisenia bicyclis* inactivates the infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus. *Archives Of Virology*, 152(5), 861–869. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0920-y>
- Kang, S. Y., Kang, J., & Oh, M. (2012). Antiviral activities of flavonoids isolated from the bark of *Rhus verniciflua* stokes against fish pathogenic viruses in vitro. *The Journal Of Microbiology*, 50(2), 293–300. <https://doi.org/10.1007/s12275-012-2068-7>
- Kim, S., Kim, S. R., Oh, M., Jung, S., & Kang, S. Y. (2011). In Vitro antiviral activity of red alga, *Polysiphonia morrowii* extract and its bromophenols against fish

- pathogenic infectious hematopoietic necrosis virus and infectious pancreatic necrosis virus. *The Journal Of Microbiology*, 49(1), 102–106. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-1035-z>
- Mendis, W. R. H., Lim, J., Jung, S., & Kang, S. Y. (2024). Antiviral effects of umbelliferone against viral hemorrhagic septicemia virus in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 152, 109767. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109767>
 - Monteiro, M., Lavrador, A. S., Santos, R., Rangel, F., Iglesias, P., Tárraga, M., Couto, A., Serra, C. R., Tafalla, C., Da Costa, E., Domingues, M. R., Oliva-Teles, A., Carvalho, A. P., Enes, P., & Díaz-Rosales, P. (2021). Evaluation of the Potential of Marine Algae Extracts as a Source of Functional Ingredients Using Zebrafish as Animal Model for Aquaculture. *Marine Biotechnology*, 23(4), 529–545. <https://doi.org/10.1007/s10126-021-10044-5>
 - Olvera-Ramírez, N. R., Medina-Jaritz, N. N. B., & Pineda-López, N. M. (2025). Determination of antimicrobial activity of *Chlamydomonas reinhardtii* extracts obtained with different solvents. *Open Access Research Journal Of Life Sciences*, 9(1), 027–031. <https://doi.org/10.53022/oarjls.2025.9.1.0022>
 - Pan, Y., Liu, Z., Quan, J., Gu, W., Wang, J., Zhao, G., Lu, J., & Wang, J. (2024). Purified Astragalus Polysaccharide Combined with Inactivated Vaccine Markedly Prevents Infectious Haematopoietic Necrosis Virus Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 10(11), 6938–6953. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.4c01478>
 - Panwong, S., Phinyo, K., Duangjan, K., Sattayawat, P., Pekkoh, J., Tragoolpua, Y., Yenchitsomanus, P., & Panya, A. (2024). Inhibition of dengue virus infection in vitro by fucoidan and polysaccharide extract from marine alga *Sargassum* spp. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 276, 133496. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133496>
 - Pyecroft, S. B., Ryan, G., & Mahadevan, J. J. (2022). Spring viremia of carp. En *Elsevier eBooks* (pp. 267–275). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812211-2.00019-6>
 - Ramakrishnan, G. S., Kamath, M. M., & Niranjana, V. (2014). Increasing Microbial Biofuel Production by In-silico Comparative Genomic Studies. *International Journal Of Bioscience Biochemistry And Bioinformatics*, 4(5), 386–390. <https://doi.org/10.7763/ijbbb.2014.v4.375>
 - Ren, G., Xu, L., Zhao, J., Shao, Y., Lin, Y., Li, L., Liu, Q., Lu, T., & Zhang, Q. (2022). Antiviral Activity of Crude Polysaccharide Derived from Seaweed against IHNV and IPNV In Vitro. *Viruses*, 14(9), 2080. <https://doi.org/10.3390/v14092080>
 - Reynolds, D., Huesemann, M., Edmundson, S., Sims, A., Hurst, B., Cady, S., Beirne, N., Freeman, J., Berger, A., & Gao, S. (2021). Viral inhibitors derived from macroalgae, microalgae, and cyanobacteria: A review of antiviral potential throughout pathogenesis. *Algal Research*, 57, 102331. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102331>
 - SARABIA IBARRA, JOSE MANUEL. *Actividad antiviral de extractos de algas frente a virus de peces*. Trabajo Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández, 2024.

- Shen, Y., Liu, L., Chen, W., Hu, Y., Zhu, B., & Wang, G. (2017). Evaluation on the antiviral activity of arctigenin against spring viraemia of carp virus. *Aquaculture*, 483, 252–262. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.001>
- Stich, A. (2014). *Emerging infectious diseases*. Elsevier eBooks. <https://doi.org/10.1016/c2012-0-07077-9>
- Vilatte, A., Spencer-Milnes, X., Jackson, H. O., Purton, S., & Parker, B. (2023). Spray Drying Is a Viable Technology for the Preservation of Recombinant Proteins in Microalgae. *Microorganisms*, 11(2), 512. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020512>
- Wang, H., Zhang, X., Wang, Z., Shan, L., Zhu, S., Liu, G., Liu, L., Hu, Y., & Chen, J. (2024). Palmatine as a Potent Immunomodulator: Enhancing Resistance to *Micropterus salmoides* rhabdovirus in Largemouth Bass through Innate Immune Activation and Viral Suppression. *Fish & Shellfish Immunology*, 154, 109928. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109928>
- World Organisation for Animal Health (2025). *Septicemia hemorrágica viral*. Organización Mundial de la Sanidad Animal. <https://www.woah.org/es/enfermedad/septicemia-hemorragica-viral/>
- World Organisation for Animal Health (2025). *Viremia primaveral de la carpa*. Organización Mundial de la Sanidad Animal. <https://www.woah.org/es/enfermedad/viremia-primaveral-de-la-carpa/>
- Yang, H., Jung, M., Avunje, S., Nikapitiya, C., Kang, S. Y., Ryu, Y. B., Lee, W. S., & Jung, S. (2017). Efficacy of algal *Ecklonia cava* extract against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Fish & Shellfish Immunology*, 72, 273-281. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.10.044>