

Estudios de interferencia viral en líneas celulares de peces Cipriniformes y Perciformes

Valeria Aguilar Quiñones

Tutor: Luis Pérez García-Estañ

Cotutora: Melissa Belló Pérez

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Grado en Biotecnología
Facultad de Ciencias Experimentales
Curso 2017/2018

ÍNDICE

Resumen y palabras clave	4
Introducción	5
1. La acuicultura en la actualidad	5
2. Virus de peces de relevancia en acuicultura	6
3. Persistencia e interferencia viral	7
4. Respuesta mediada por interferón en peces	8
Antecedentes y objetivos	10
Materiales y métodos	12
1. Cultivos celulares	12
1.1. Medios de cultivo	12
1.2. Líneas celulares	12
2. Virus e infecciones	13
2.1. Virus empleados	13
2.2. Técnicas de infección	13
3. Tinciones	14
3.1. Cristal Violeta	14
3.2. Giemsa	14
4. Medidas de densidad óptica y microscopía óptica	14
4.1. Medidas de densidad óptica	14
4.2. Microscopía óptica	15
Resultados	16
1. Interferencia de IPNV con Rhabdovirus en células EPC (Cipriniformes)	16
1.1. Resistencia de células EPC ^{IPNV-Sp} y EPC ^{IPNV-LW} a VHSV	16
1.2. Resistencia de células EPC ^{IPNV-Sp} y EPC ^{IPNV-LW} a SVCV	18
1.3. IPNV no interfiere con SVCV en coinfecciones o superinfecciones ..	19
1.4. Actividad antiviral de medios condicionados procedentes de EPC ^{IPNV-Sp} y EPC ^{IPNV-LW} sobre células EPC	19
2. Interferencia de IPNV con Rhabdovirus en células SAF (Perciformes)	21

2.1.	Resistencia de células SAF ^{IPNV-Sp} y SAF ^{IPNV-LW} a VHSV	21
2.2.	Resistencia de células EPC ^{IPNV-Sp} y EPC ^{IPNV-LW} a SVCV	23
2.3.	Actividad antiviral de medios condicionados procedentes de SAF ^{IPNV-Sp} y SAF ^{IPNV-LW} sobre células SAF	24
Discusión		26
1.	Introducción	26
2.	Fenómeno de interferencia viral	27
2.1.	Fenómeno de interferencia viral en Cipriniformes	27
2.2.	Fenómeno de interferencia viral en Perciformes	29
Conclusiones y proyección futura		31
Referencias y bibliografía		32

RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

En investigaciones previas se consiguió caracterizar la línea EPC de carpa (Cipriniformes) infectada persistentemente con la cepa Sp (europea) de IPNV (EPC^{IPNV-Sp}) y se demostró su resistencia frente a virus heterólogos como VHSV y que secreta al medio factores que inducen protección frente a superinfecciones. En este trabajo se perseguía utilizar una cepa de diferente origen geográfico de IPNV para estudiar si el fenómeno de interferencia viral era específico de cepa. Se escogió la cepa LWVRT60 (americana), para establecer una infección persistente en células EPC (EPC^{IPNV-LW}). Además, se generaron líneas persistentemente infectadas de un grupo distinto de peces (Perciformes). Se utilizó para ello la línea celular SAF de dorada (SAF^{IPNV-Sp} y SAF^{IPNV-LW}) y se comprobó que las características de éstas eran similares a las de EPC^{IPNV-Sp} y EPC^{IPNV-LW} puesto que también son resistentes ante infecciones de VHSV. Se probó también si las cuatro líneas portadoras de IPNV resistían infecciones de otros rhabdovirus, como el SVCV. En ensayos de formación de calvas se comprobó que, efectivamente, eran resistentes a SVCV. Además, se ha constatado que los medios condicionados de estas líneas celulares inducen resistencia ante VHSV.

Palabras clave: interferencia viral, virus de peces, respuesta inmune, cultivo celular

Summary: Previous studies successfully characterised the cell line EPC from carp (cyprinid) persistently infected with the Sp strain (European) of IPNV (EPC^{IPNV-Sp}). Its resistance against heterologous viruses, such as VHSV, was proved along with their capacity of antiviral factors secretion that induce cell protection against superinfections. In this project, the objective was to use an IPNV strain from a different geographic area in order to study whether the viral interference phenomenon was strain-specific or not. The chosen strain to infect persistently EPC cells was an American one corresponding to LWVRT60 (EPC^{IPNV-LW}). In addition, persistently infected cell lines from a different group of fish (perciform) were generated using the cell line SAF from gilt-head bream (SAF^{IPNV-Sp} y SAF^{IPNV-LW}) and it was proven that their characteristics are very similar to the cell lines EPC^{IPNV-Sp} and EPC^{IPNV-LW} as they also show resistance against VHSV infections. It was also proved that the four IPNV-carrier cell lines also resisted other rhabdovirus infections, such as SVCV. Plaque assays confirmed that the four cell lines were resistant to superinfection with SVCV. The antiviral activity of conditioned media from IPNV-carrier cell lines was also tested. As a result, these media are able to induce protection against VHSV in susceptible cells.

Keywords: viral interference, fish viruses, immune response, cell culture

INTRODUCCIÓN

1. La acuicultura en la actualidad

Los productos acuícolas constituyen una de las fuentes de proteína animal más importantes del mundo. Según la Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en 2013 el 17% de la ingesta de proteína animal provino de la toma de productos acuícolas. Cabe destacar que, además del aporte proteico, el pescado contiene también ácidos grasos esenciales (EPA y DHA), vitaminas (D, A y B) y minerales (calcio, hierro y zinc entre otros) que convierten al pescado en un producto con unos valores nutricionales muy buenos y, por tanto, muy demandado.

La creciente demanda global de productos acuícolas es un reto al que solamente se ha podido abordar sumando la acuicultura a la pesca. En el año 2015, la producción acuática mundial fue de 199.7 millones de toneladas y ha ido creciendo de forma continua durante las últimas cinco décadas (**Figura 1**). Además, el consumo *per cápita* de este tipo de productos ha pasado de los 9.9 kg (1960) a 20.0 kg (2014) gracias al aumento de las producciones, mejoras en técnicas de conservación del pescado y unos canales de distribución más eficientes.

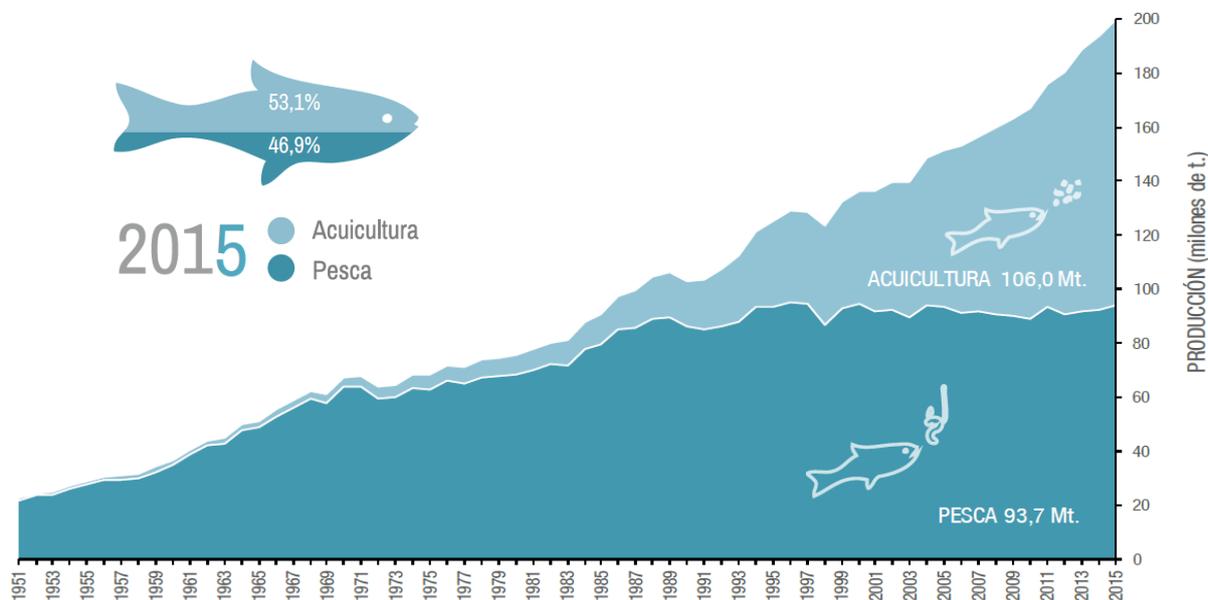


Figura 1. Evolución de la producción de acuicultura y pesca mundial en el periodo 1950 – 2015 (FAO).

Sin embargo, la industria de la acuicultura ve comprometida su producción debido a enfermedades infecciosas de origen bacteriano y vírico. Un ejemplo del daño que causan los virus en acuicultura es el brote del Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral (VHSV) en el año 2000 que afectó a dos granjas en Dinamarca en las que se crecían trucha arcoíris. La tasa

de mortalidad de estos peces en las granjas fue aproximadamente del 50%, afectando así en gran medida a la producción de trucha arcoíris (165 toneladas) (Nylin & Olesen, 2001). Centrándonos en las infecciones víricas, éstas suponen una importante amenaza para la industria y es por ello que hay un gran interés en investigar el proceso infectivo en peces, sus mecanismos de defensa y el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos que sean efectivos frente a estas infecciones, así como el desarrollo de vacunas para prevenirlas.

2. Virus de peces de relevancia en acuicultura

El Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) es un virus que pertenece a la familia *Birnaviridae*, concretamente, al género *Aquabirnavirus*. Se trata de un virus no envuelto con morfología icosaédrica y un tamaño de aproximadamente 60 nm de diámetro. Su genoma es bisegmentado de RNA bicatenario. El segmento A del genoma (3 kb) codifica para las proteínas VP2, VP3, VP4 y VP5, mientras que el segmento B lo hace para la proteína VP1. Este virus ha sido identificado en países como Australia, Canadá, Chile, Dinamarca, Escocia, España, Japón, Noruega y Suiza entre otros, por lo que es considerado un virus de distribución mundial. Es el responsable de la necrosis pancreática en peces, que afecta a un gran número de especies, pero sobre todo a salmónidos (peces de importancia en acuicultura). El IPNV es capaz de producir infecciones asintomáticas en un amplio rango de peces de interés comercial, fundamentalmente en trucha y salmón (Reno, 1999). También se ha demostrado que produce infección lítica con efecto citopático claro en líneas celulares de trucha (RTG-2) y salmón (CHSE-214) (Lorenzen *et al.*, 1999). Además, las células que sobreviven a la infección pueden convertirse en células persistentemente infectadas con una producción continua de virus (Rodríguez Saint-Jean *et al.*, 2010), como por ejemplo las células EPC (Epitelioma Papuloso de Carpa) y SAF (*Sparus Aurata* fibroblast) estudiadas en este trabajo (Parreño *et al.*, 2016).

El Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral (VHSV) perteneciente a la familia *Rhabdoviridae*, género *Novirhabdovirus*, es un virus envuelto con un genoma de RNA negativo monocatenario que codifica para las siguientes proteínas: proteína de la nucleocápside (N), fosfoproteína (P), proteína de la matriz (M), glicoproteína de superficie (G), NV (proteína no estructural) y una polimerasa (L). Este virus es capaz de infectar un gran número de especies de pez tanto de agua dulce como salada (especialmente salmón y trucha) y el número de especies susceptibles va cada vez en aumento (actualmente afecta a más de 50 especies) (Al-Hussinee *et al.*, 2011). Este virus se distribuye por el hemisferio norte, sobre todo, en países europeos, aunque también ha sido aislado en algunas zonas de Estados Unidos, como en

Washington. Causa una de las enfermedades virales más importantes de los peces en la acuicultura europea: la septicemia hemorrágica. *In vitro* causa una infección lítica con efecto citopático y elevada muerte celular en líneas celulares de EPC y SAF.

El Virus de la Viremia Primavera de la Carpa (SVCV) es también un virus de la familia *Rhabdoviridae*, pero perteneciente al género *Spryivirus* y como tal, su estructura es muy parecida al del VHSV. Tiene un genoma de RNA monocatenario de sentido negativo y codifica para las mismas proteínas que VHSV salvo para la proteína NV. En lo referente a distribución geográfica, el SVCV principalmente se halla en Europa, aunque también se ha detectado en Estados Unidos y China. Es un virus que afecta principalmente a ciprínidos (Ahne *et al.*, 2002) produciendo en ellos la enfermedad conocida como viremia primaveral de la carpa, que se asocia con exoftalmia, distensión abdominal y hemorragias en piel y branquias (García-Valtanen *et al.*, 2017).

Las enfermedades causadas por los últimos dos virus, VHSV y SVCV, están incluidas en la Lista de Enfermedades más relevantes de peces (2018) elaborada por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

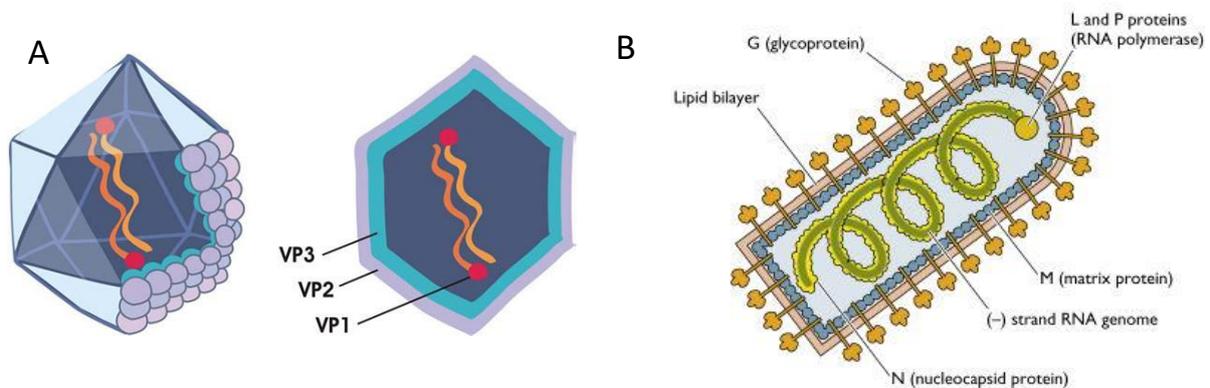


Figura 2. Partícula viral del virus IPNV (A). Partícula viral típica de los virus de la familia *Rhabdoviridae* como lo son el VHSV y SVCV (B).

3. Persistencia e interferencia viral

En algunos casos, los peces que han sobrevivido a una infección pueden convertirse en portadores del virus y transmitirlo así a otros peces (Gadan *et al.*, 2013; Julin *et al.*, 2014). Normalmente, los peces portadores se vuelven inmunes frente a infecciones de ese mismo virus, pero rara vez ocurre que adquieran protección frente a otros. Este fenómeno puede simularse *in vitro* estableciendo una infección persistente en una línea celular (Ballesteros *et*

al., 2015). Por infección persistente se entiende, una infección en la que hay una producción continua de virus sin que las células infectadas mueran. Se llega a un equilibrio entre el cultivo celular y el virus en el que las partículas víricas que se producen no causan un efecto citopático apreciable, pero se mantienen en el cultivo. Los cultivos persistentemente infectados son de gran interés puesto a que pueden mostrar resistencia frente a infecciones causadas por otros virus: interferencia viral, es decir, la inhibición de la replicación de un virus por la presencia de otro virus diferente en la misma célula.

Algunas demostraciones de interferencia viral en cultivo celular se han evidenciado entre IPNV y el virus de la Necrosis Hematopoyética Infecciosa (IHNV) (Alonso *et al.*, 1999) donde células BF-2 (procedentes de *Lepomis macrochirus*) infectadas con IPNV y superinfectadas con IHNV muestran resistencia ante la segunda infección.

Los fenómenos de interferencia viral no solo ocurren a nivel *in vitro*, sino que hay numerosos estudios realizados *in vivo* en los que también se observa y queda demostrado este fenómeno, entre los que cito alguno de ellos:

- Interferencia viral entre IPNV e IHNV en trucha arcoíris (*Onchorhynchus mykiss*). (Byrne *et al.*, 2008).
- Interferencia viral entre IPNV y el virus de la Anemia Infecciosa del Salmón (ISAV) en salmón (*Salmo salar*) (Johansen & Sommer, 2001).
- Interferencia viral entre IPNV y VHSV en *Solea senegalensis* (lenguado) (López-Vázquez *et al.*, 2017).
- Interferencia viral entre *Piscine orthoreovirus* (PRV) e IHNV en *Salmo salar*. (Vendramin *et al.*, 2018).
- Interferencia viral entre PRV y SAV (*Alphavirus* de salmón) en *Salmo salar*. (Lund *et al.*, 2016).

4. Respuesta mediada por interferón en peces

El sistema de interferón (IFN) tipo I es un mecanismo clave en la respuesta inmune innata frente a infecciones víricas y está relacionado con una protección no específica. Las señales a través de receptores de reconocimiento de patógeno (PRRs) conducen a la activación de dicho sistema, que media la respuesta temprana frente a virus siendo así la primera línea de defensa ante ellos (Purcell *et al.*, 2012). Las moléculas de IFN-I son producidas por diversos

tipos celulares y tienen la capacidad de inducir en las células un estado antiviral, al activar la expresión de genes estimulados por interferón (ISG) que codifican para factores y proteínas con actividad antiviral como la viperina, la proteína Mx, ISG15, entre otros (Zou & Secombes, 2011).

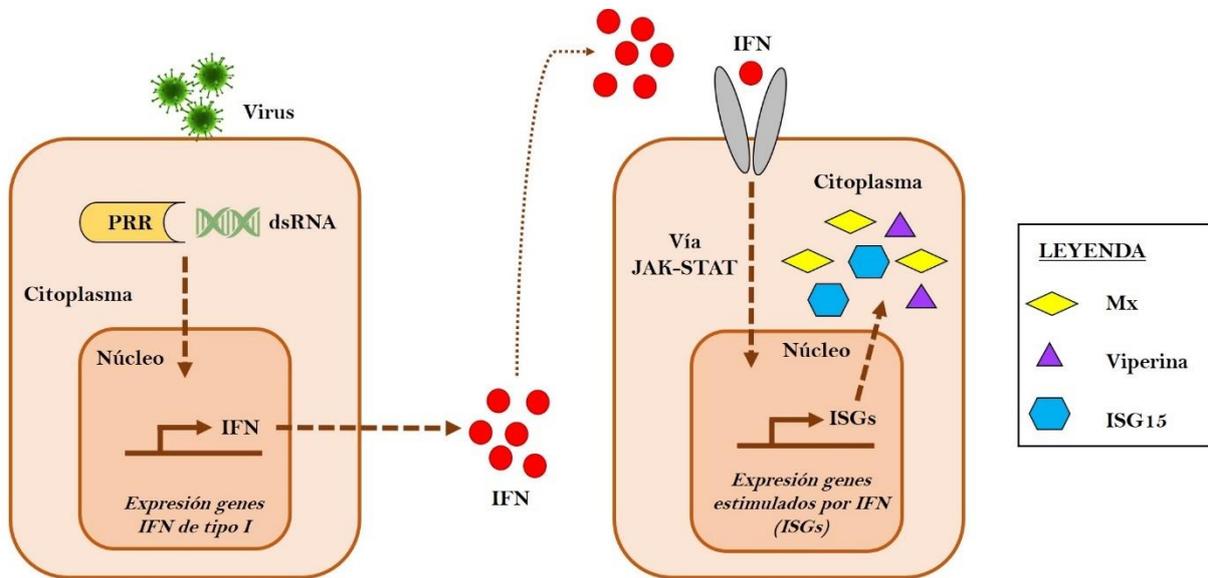


Figura 3. Esquema simplificado del sistema de IFN de tipo I en el que se muestra la estimulación de la transcripción de genes de respuesta a interferón (ISGs). Adaptado de: Syedbasha & Egli (2017).

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

1. Antecedentes

Este trabajo se basa en investigaciones previas de nuestro grupo (García *et al.*, 2011; Jurado *et al.*, 2013; Parreño *et al.*, 2016) en las que se logró generar una infección persistente con IPNV en la línea celular de EPC (procedente de carpa). Se eligió la línea celular EPC debido a: a) que la reducida susceptibilidad de estas células a ser infectadas por IPNV brindaba un modelo muy bueno para generar una infección persistente y b) la elevada susceptibilidad que estas células presentan frente a los rhabdovirus (VHSV y SVCV) permite investigar el fenómeno de interferencia viral mediado por IPNV sobre la infección de otros virus. A las células EPC persistentemente infectadas con IPNV se las nombró como EPC^{IPNV} (en este caso se utilizó la cepa Sp del virus).

Se comprobó si la infección persistente con IPNV interfería de algún modo en la infección de VHSV, obteniendo como resultado que, efectivamente, las células EPC^{IPNV} adquirirían resistencia frente a la superinfección por VHSV (Jurado *et al.*, 2013). Además, se descubrió que el medio condicionado de este cultivo también era capaz de inducir resistencia frente a VHSV en cultivos de EPC, que normalmente son susceptibles a la infección. Teniendo en cuenta estos resultados, se especuló que las células persistentemente infectadas con IPNV podrían estar liberando al medio factores antivirales solubles que fueran los responsables de la inducción del estado antiviral en células, que normalmente, son susceptibles a la infección.

Por último, se realizaron estudios de interacción entre dos cultivos celulares diferentes (EPC y EPC^{IPNV}) a través de sistemas de co-cultivo para indagar más sobre la producción de esos factores antivirales que estarían liberando al medio los cultivos persistentemente infectados (EPC^{IPNV}) (Parreño *et al.*, 2016).

2. Objetivos

El planteamiento inicial para este trabajo fue el de generar, de nuevo, la línea de EPC persistentemente infectada con IPNV y comprobar así si las características de ésta se mantienen en otros tipos celulares. Se escogió una línea celular que perteneciera a un grupo de peces que no fueran ciprínidos, eligiendo así la línea celular SAF procedente de dorada, que es una especie perteneciente al orden de los Perciformes y de gran importancia acuícola. Por otro lado, también se quiso comprobar si los fenómenos de interferencia viral descritos en la línea EPC^{IPNV} estaban restringidos a la cepa Sp (europea) y por ello, en el presente trabajo, se

utilizó una cepa de IPNV de un origen geográfico diferente (América) para generar líneas persistentemente infectadas con esta cepa (cepa LW) tanto en EPC como en SAF. Concretamente, los objetivos marcados para este trabajo fueron los siguientes:

1. Uso de la cepa LWVRT60 de IPNV para establecer una infección persistente en células EPC y SAF.
2. Caracterizar las propiedades antivirales de las nuevas líneas portadoras de IPNV ($EPC^{IPNV-LW}$, $SAF^{IPNV-Sp}$ y $SAF^{IPNV-LW}$) en comparación con la línea de referencia $EPC^{IPNV-Sp}$.
3. Obtener medios condicionados de estas líneas y analizar si los medios procedentes de $EPC^{IPNV-LW}$ y $SAF^{IPNV-LW}$ son capaces de inducir protección frente a un virus heterólogo (VHSV).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares

1.1 Medios de cultivo

En este trabajo se empleó medio RPMI-1640 Dutch con 20 mM HEPES suplementado con un 10% de suero bovino fetal, 1 mM de piruvato, 2 mM de glutamina y antibióticos (50 µg/mL de gentamicina y 2 µg/mL de anfotericina B) para el cultivo y mantenimiento de las líneas celulares EPC, EPC^{IPNV-Sp} y EPC^{IPNV-LW}. En los casos en que se usaron algunas de estas líneas para infecciones víricas, el mismo medio, es suplementado con un 2% de suero bovino fetal en lugar de con un 10% de éste. Ambos medios se abrevian en este trabajo como RPMI-10% y RPMI-2% respectivamente.

Para el cultivo y mantenimiento de las líneas celulares SAF, SAF^{IPNV-Sp} y SAF^{IPNV-LW} se empleó medio Leibovitz L-15 suplementado con un 10% de suero bovino fetal, 1 mM de piruvato, 2 mM de glutamina y antibióticos (50 µg/mL de gentamicina y 2 µg/mL de anfotericina B). Para las infecciones víricas de estas líneas se usó el mismo medio, pero suplementado con un 2% de suero bovino fetal. Ambos medios se abrevian en este trabajo como L-15 10% y L-15 2% respectivamente.

Se empleó metil celulosa (8 mg/mL en medio RPMI-10% a pH 7) para los ensayos de formación de calvas puesto que se trata de un líquido denso que dificulta la distribución del virus por todo el cultivo, limitando así la infección a células adyacentes por lo que al final resultará en la formación de calvas.

1.2 Líneas celulares

Las células EPC (Epitelioma Papullosum Cyprini) son células epiteliales cuyo origen se encuentra en un pez perteneciente a la familia *Cyprinidae*, la carpa *Pimephales promelas*. Dicha línea celular fue adquirida de la Colección Europea de Cultivos Celulares Autenticados (ECACC), cuyo número de identificación es: ECACC nº 93120820. Esta línea celular fue mantenida a una temperatura de 25 °C en una atmósfera al 5% de CO₂ en botes de cultivo de 25 cm² (~ 7,5 millones de células) en medio RPMI-10%.

Las células SAF (*Sparus Aurata* fibroblast) son fibroblastos procedentes de la dorada (*Sparus aurata*), que es un pez perteneciente al orden de los Perciformes. Dicha línea celular fue cedida muy amablemente por el Dr. Mulero (Universidad de Murcia). Los cultivos de SAF fueron mantenidos a una temperatura de 25 °C en una atmósfera al 5% de CO₂ en botes de cultivo de 25 cm² (~ 2,5 millones de células) en medio L-15 10%.

Se empleó una solución al 0.05% de tripsina-EDTA para subcultivar ambas líneas celulares (EPC y SAF) y hacer que las células se despegaran de los botes para así diluirlas con el medio de cultivo adecuado (RPMI-10% - EPC y L-15 10% - SAF) en el volumen necesario y sembrar así nuevos botes de cultivo o placas con pocillos.

2. Virus e infecciones

2.1 Virus empleados

En el presente trabajo se han utilizado diferentes virus pertenecientes a familias distintas. Dentro de la familia *Birnaviridae*, género *Aquabirnavirus* se han empleado dos cepas diferentes del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV). Una de ellas es la cepa Sp (europea) y la otra se corresponde con la cepa LWVRT60 (americana) abreviada en este trabajo como cepa LW.

Se han usado otros dos virus pertenecientes a la familia *Rhabdoviridae*. El primero de ellos es del género *Novirhabdovirus*, el Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral (VHSV-07.71) aislado a partir de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en Francia. El segundo pertenece al género *Spryivivirus* y se trata del Virus de la Viremia Primavera de la Carpa (SVCV 56/70) aislado de carpa.

2.2 Técnicas de infección

Para las infecciones víricas en placas, se diluye el volumen de virus necesario en el medio de cultivo que corresponda (RPMI-2% - EPC o L-15 2% - SAF). A continuación, se retira el medio de los pocillos que contienen monocapas celulares con una bomba de vacío y se añade la dilución del virus. Dependiendo de la placa que se vaya a infectar, se pondrán 150 µl/pocillo (placa de 96 pocillos) o 500 µl/pocillo (placa de 24 pocillos). Según el diseño experimental dejaremos el virus en la placa hasta que finalice la infección o se incuban las monocapas con el virus durante 90 minutos que, transcurrido ese tiempo, el virus se retira con

una bomba de vacío y se añade bien medio fresco o metil celulosa en el caso de realizar un ensayo de formación de calvas. Las placas serán incubadas a la temperatura óptima del virus empleado: en las infecciones con IPNV y VHSV las placas serán incubadas a 14 °C y en los casos de infección por SVCV, éstas serán incubadas a 23 °C.

3. Tinciones

3.1 Cristal Violeta

La tinción de cristal violeta fue preparada 1% peso/volumen usando como disolvente una disolución 1:9 de formaldehído en agua mili-Q (Milli-Q® A10 Water Purification System, Merck Millipore). Para teñir las placas de 96 pocillos se añaden 75 µl/pocillo de cristal violeta. En el caso de las placas de 24 pocillos, el volumen que se añade es de 0,5 mL/pocillo. Se deja incubar la placa con el cristal violeta un mínimo de 1 hora y un máximo de 5 horas. Posteriormente, la placa es lavada sumergiéndose en un barreño con agua destilada y se deja secar.

3.2 Giemsa

La tinción de Giemsa empleada en los experimentos de este trabajo fue preparada a una concentración de 5 mg/mL usando como disolvente una disolución 1:15 de PBS en agua mili-Q (Milli-Q® A10 Water Purification System, Merck Millipore). Para la tinción con Giemsa de placas de 96 pocillos es necesario fijar previamente las células con metanol glaciado 100% durante 15 minutos (100 µl/pocillo) a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se añaden 75 µl/pocillo de Giemsa y se deja incubar la placa durante 20 minutos. A continuación, se lava la placa en un barreño con agua destilada y se deja secar.

4. Medidas de densidad óptica y microscopía óptica

4.1 Medidas de densidad óptica

En varios experimentos se midió la densidad óptica para determinar la supervivencia celular y se usó espectrofotometría de absorción para ello. Se midió la absorbancia a 570 nm con un espectrofotómetro de placas (EON™, Biotek® Instruments). A las placas de 96 pocillos teñidas con Giemsa que se midieron, se incubaron con 100 µl/pocillo de metanol 100% durante 30 minutos sobre un agitador de placas (SSM1, Stuart).

4.2 Microscopía óptica

Para visualizar los signos de infección en las células y evaluar el efecto citopático de los virus empleados se observaron las placas teñidas al microscopio (Nikon Eclipse TE2000-U; Nikon instruments, inc., NY, USA). Las fotografías tomadas se realizaron con una cámara digital acoplada al microscopio (Nikon DS-1QM).

RESULTADOS

1. Interferencia de IPNV con *Rhabdovirus* en células EPC (Cipriniformes)

1.1 Resistencia de células EPC^{IPNV-Sp} y EPC^{IPNV-LW} a VHSV

Se utilizaron dos cepas diferentes del virus IPNV, una de ellas procedente de Europa (cepa Sp) (Cutrin *et al.*, 2000) y la otra aislada en América (cepa LWVRT60) (Zhang *et al.*, 2004) la cual abreviamos como LW, para generar líneas celulares de EPC persistentemente infectadas por estas cepas y a las cuales denominamos EPC^{IPNV-Sp} y EPC^{IPNV-LW}. Para ello, se infectaron células EPC con el virus IPNV a una multiplicidad de infección (moi) de 0.05 virus/célula. Uno de los botes fue infectado con la cepa Sp del virus y el otro con la cepa americana (cepa LW). Se incubaron los botes a una temperatura de 21 °C, la cual no es óptima ni para las células (25 °C) ni para el virus (14 °C) consiguiendo así que el virus no genere daños severos al cultivo. Transcurridos 3 días, se procedió a retirar el medio de los botes y se realizó un pase a las células.

Para comprobar el éxito de la generación de las líneas persistentemente infectadas, se evaluó la resistencia de estas líneas (EPC^{IPNV-Sp} y EPC^{IPNV-LW}) a la infección con VHSV debido a que en el laboratorio ya se ha demostrado en trabajos anteriores que las líneas de EPC infectadas persistentemente con IPNV^{Sp} son resistentes ante una superinfección con VHSV (Parreño *et al.*, 2016). Por tanto, se sembró una placa de 96 pocillos con células EPC, EPC^{IPNV-Sp} y EPC^{IPNV-LW} y se infectó con VHSV a multiplicidades de infección crecientes (0.01, 0.05, 0.1 y 0.5). Además, también se midió la absorbancia a 570 nm para tener una medida cuantitativa de la supervivencia celular.

Las líneas EPC^{IPNV-Sp} y EPC^{IPNV-LW} fueron generadas correctamente (**Figura 4**) al mostrar resistencia frente VHSV, incluso a la más alta moi utilizada, a diferencia de las células EPC, que sí fueron susceptibles a la infección por el virus y como tal se observan los pocillos completamente arrasados en todas las multiplicidades de infección testadas.

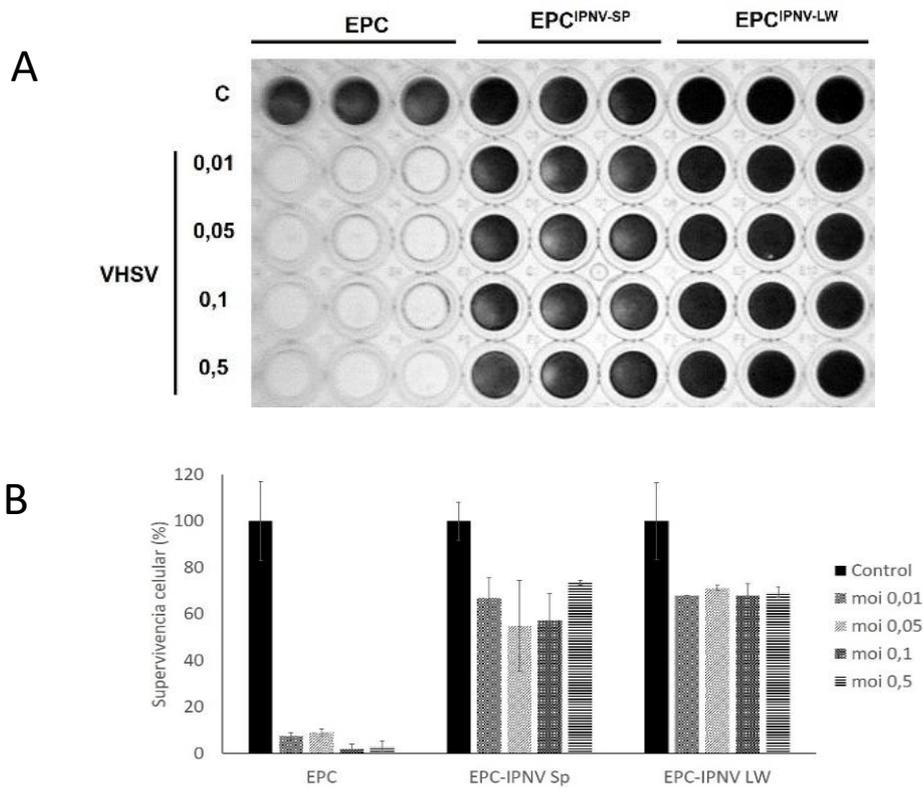


Figura 4A. Resistencia de las células EPC^{IPNV-Sp} y EPC^{IPNV-LW} frente a multiplicidades crecientes de VHSV (0.01, 0.05, 0.1 y 0.5). Se fijaron las células a los 5 dpi con metanol y se tiñeron con Giemsa. **4B.** Supervivencia celular ante infección por VHSV. Medida de la absorbancia a 570 nm. Se representa la absorbancia medida de los pocillos \pm la desviación estándar. El 100% es la media de absorbancia de las células sin infectar.

Adicionalmente realizamos un ensayo de formación de calvas (**Figura 5**) con el virus VHSV en el cual se sembró una placa de 24 pocillos con las células EPC, EPC^{IPNV-Sp} y EPC^{IPNV-LW}. Las células estuvieron en contacto con el virus durante 90 minutos y a continuación, se puso bien metil celulosa o medio líquido (RPMI-10%).

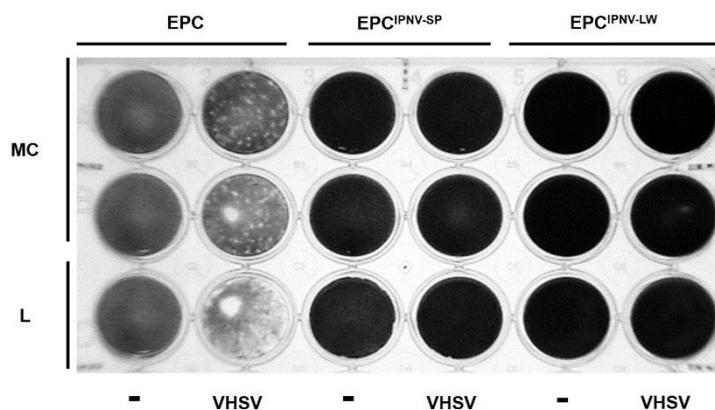


Figura 5. Ensayo de formación de calvas con células EPC, EPC^{IPNV-Sp} y EPC^{IPNV-LW} infectadas con VHSV (2000 virus/pocillo) en metil celulosa (MC) o medio líquido RPMI-10% (L). Fueron teñidas a los 10 dpi con cristal violeta.

De nuevo, se observa que las líneas persistentemente infectadas con las cepas de IPNV son resistentes a la superinfección con VHSV mientras que las EPC no y podemos ver en los pocillos correspondientes a la metil celulosa, como signo de infección, la aparición de calvas. Por tanto, al confirmar que ambos cultivos generados muestran resistencia podemos decir que las líneas persistentemente infectadas con IPNV ($EPC^{IPNV-Sp}$ y $EPC^{IPNV-LW}$) fueron generadas con éxito y se usarán como referencia de otras líneas celulares portadoras de IPNV que se generaron más adelante.

1.2 Resistencia de células $EPC^{IPNV-Sp}$ y $EPC^{IPNV-LW}$ a SVCV

Con el objetivo de estudiar mejor la resistencia que muestran las líneas celulares generadas, quisimos comprobar si dicha resistencia también se manifestaría ante otro rhabdovirus. Por ello, se realizó un nuevo ensayo de formación de calvas infectando, esta vez, con un virus perteneciente a la familia *Rhabdoviridae* que fuera distinto al VHSV, el SVCV que, además, infecta a una temperatura diferente que el VHSV, más próxima a la temperatura óptima de las células.

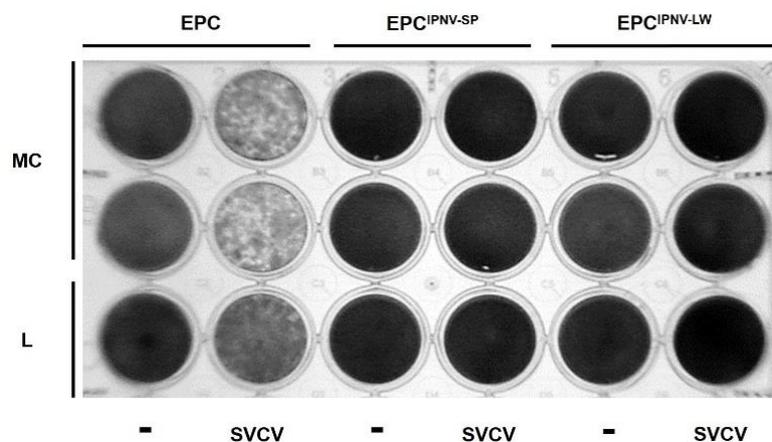


Figura 6. Ensayo de formación de calvas con células EPC, $EPC^{IPNV-Sp}$ y $EPC^{IPNV-LW}$ infectadas con SVCV (500 virus/pocillo) a 23 °C en metil celulosa (MC) o medio líquido RPMI-10% (L). Fueron teñidas a los 4 días post-infección con cristal violeta.

De igual manera que ocurría con la superinfección con VHSV, se observa que al infectar con SVCV, las células $EPC^{IPNV-Sp}$ y $EPC^{IPNV-LW}$ son resistentes (**Figura 6**) al no observar ningún signo de infección. Por el contrario, se ve la formación de calvas en los pocillos de metil celulosa correspondientes a las células EPC infectadas con el virus.

1.3 IPNV no interfiere con SVCV en coinfecciones o superinfección

Se realizó un experimento para estudiar la posible interferencia viral entre los virus IPNV y SVCV. Para ello, se sembró una placa de 24 pocillos con células EPC. Algunos pocillos fueron infectados simultáneamente con IPNV y SVCV, otros se infectaron primero con SVCV dejando a éste en contacto con las células durante 2 horas y posteriormente siendo infectados con IPNV y otros pocillos fueron infectados en primer lugar con SVCV, a las dos horas se retiró el virus y se puso medio RPMI-2% durante otras 2 horas, transcurridas las cuales se volvieron a infectar dichos pocillos con IPNV.

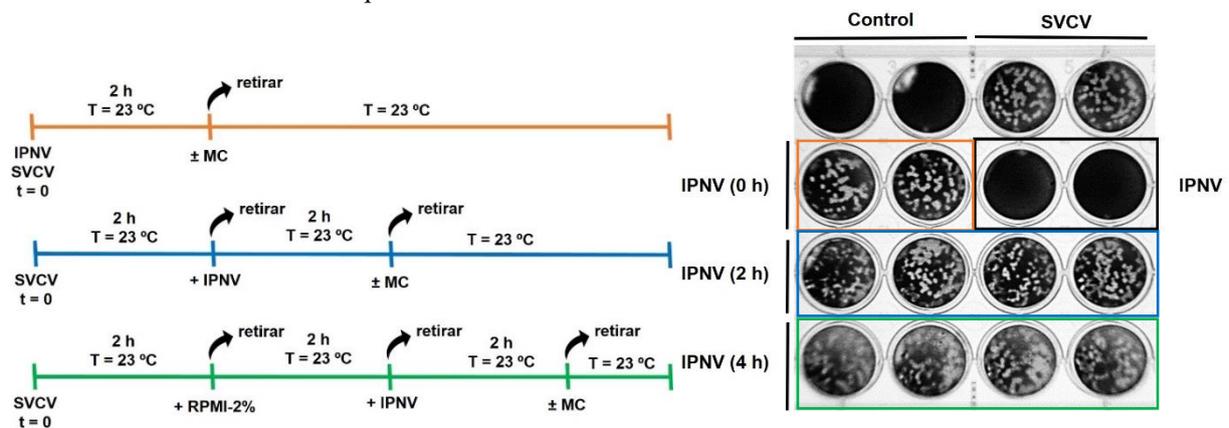


Figura 7. Interferencia viral entre IPNV-Sp y SVCV. Las infecciones con IPNV-Sp y SVCV fueron hechas como indica el esquema a 100 virus/pocillo y a una temperatura de infección de 23 °C. Se retiró en todos los casos el virus (a las 2, 4 o 6 horas) y se añadió metil celulosa (MC). La placa fue teñida con cristal violeta a los 5 días post-infección.

Como resultado del experimento, se puede comprobar que el IPNV no interfiere en coinfecciones con SVCV (**Figura 7**) puesto que en todos los casos se observa la aparición de calvas como signo de infección. Por lo que no importa a qué tiempo sea el IPNV añadido, éste no consigue interferir la infección por SVCV, y las células EPC acaban siendo lisadas.

1.4 Actividad antiviral de medios condicionados procedentes de $EPC^{IPNV-Sp}$ y $EPC^{IPNV-LW}$ sobre células EPC

Se realizaron experimentos para estudiar la potencial actividad antiviral de los medios condicionados (ss) de los cultivos de $EPC^{IPNV-Sp}$ y $EPC^{IPNV-LW}$ sobre células EPC (resistencia homóloga). De esta manera, se puede comprobar si los cultivos portadores de IPNV secretan al medio moléculas capaces de inducir una protección a las células EPC ante una infección, ya que estas células de por sí son sensibles.

Para el experimento, se sembró una placa de 96 pocillos con células EPC, las cuales estuvieron en contacto con medios condicionados (ss EPC, ss EPC^{IPNV-Sp} o ss EPC^{IPNV-LW}) durante 24 horas. Realizamos diferentes diluciones de estos medios condicionados (1:4, 1:8, 1:16 y 1:32) para ver así hasta cuándo se lograba conseguir la inducción de protección. Pasadas las 24 horas, se retiraron los medios condicionados y se infectó la placa con el virus VHSV (moi: 0.01 virus/célula) y se fijaron a los 5 días post-infección (dpi) con metanol y tiñeron con Giemsa (5 mg/mL).

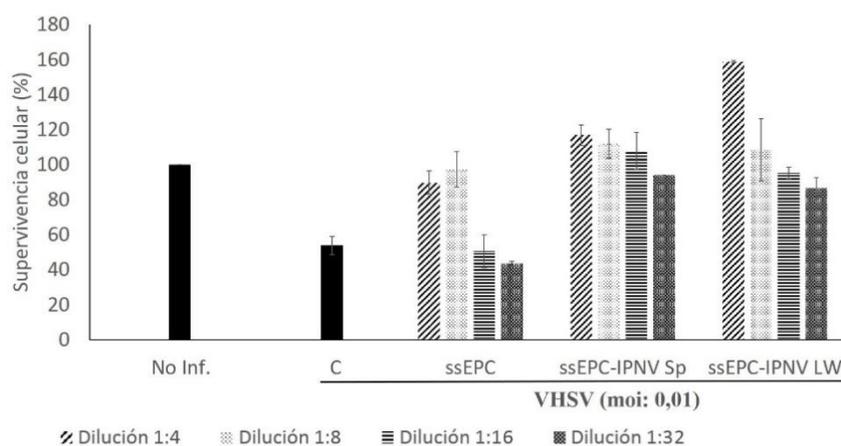


Figura 8. Resistencia de las células EPC a VHSV (moi: 0,01 virus/célula) habiendo sido incubadas durante 24 horas con medios condicionados de EPC, EPC^{IPNV-Sp} o EPC^{IPNV-LW} a diferentes diluciones (1:4 – 1:32). La absorbancia de la placa fue medida a 570 nm. La media de las absorbancias de los pocillos sin infectar se tomó como el 100% de supervivencia celular y se usó para calcular la supervivencia relativa del resto de pocillos.

Los resultados del experimento (**Figura 8**) indican que ambos medios condicionados procedentes de las líneas persistentemente infectadas inducen protección a las células EPC frente a VHSV a todas las diluciones probadas, volviendo a éstas resistentes ante la infección.

Tras los resultados obtenidos, decidimos realizar otro experimento empleando los medios condicionados, pero esta vez, inactivándolos previamente con radiación ultravioleta (UV). Así, nos aseguraríamos de eliminar cualquier interferencia que pueda haber por parte del virus IPNV que pueda estar presente en estos medios condicionados procedentes de las líneas EPC^{IPNV-Sp} y EPC^{IPNV-LW}. Así pues, planteamos el experimento de igual forma que el anterior con la diferencia de que los medios condicionados que estuvieron en contacto 24 horas con las células fueron previamente inactivados por radiación UV.

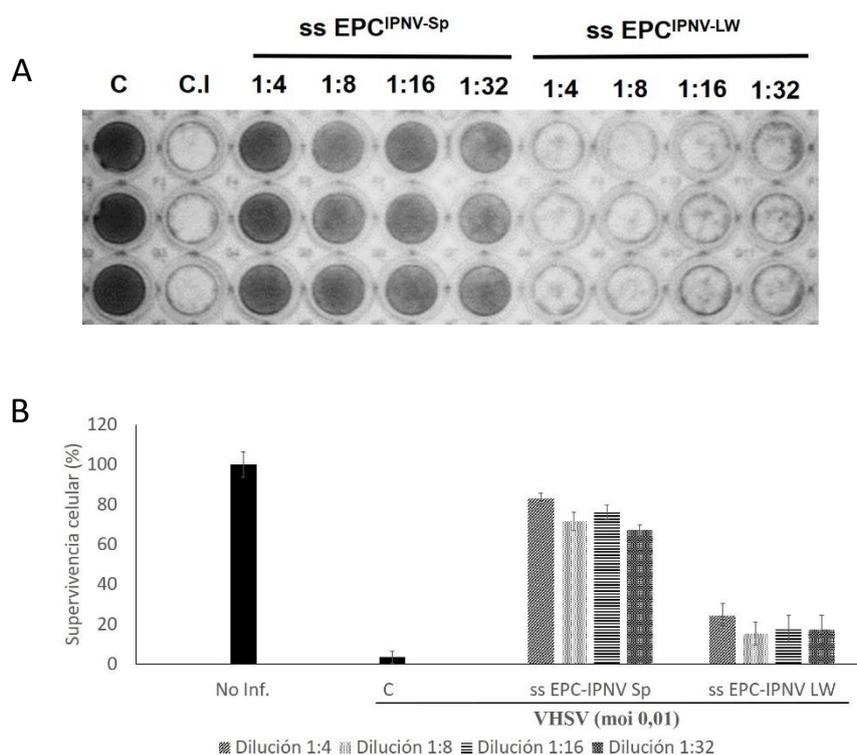


Figura 9A. Células EPC cultivadas durante 24 horas con medio RPMI 10% o con medios condicionados inactivados por UV (ss) procedentes de cultivos de células EPC^{IPNV-Sp} y EPC^{IPNV-LW} a diferente dilución. Se infectaron posteriormente con VHSV (moi: 0.01 virus/célula) y se fijaron con metanol a los 6 días post-infección y se tiñeron con Giemsa. **9B.** Supervivencia celular ante infección por VHSV. Medida de la absorbancia a 570 nm y se tomó el 100% de supervivencia celular, la absorbancia medida de los pocillos control sin infectar.

Inactivando los medios condicionados se observa que los correspondientes al cultivo EPC^{IPNV-Sp} son los únicos que protegen a las células EPC frente a la infección por VHSV (**Figura 9**). Por otro lado, los medios condicionados cuyo origen radica en el cultivo de EPC^{IPNV-LW}, no han inducido apenas protección a las células. Además, se puede observar también que la protección conseguida con ss EPC^{IPNV-Sp} es ligeramente mayor a la menor dilución probada (1:4) en comparación con el resto de las diluciones testadas, que también protegen, pero obteniéndose porcentajes de supervivencia celular menores.

2. Interferencia de IPNV con *Rhabdovirus* en células SAF (Perciformes)

2.1 Resistencia de células SAF^{IPNV-Sp} y SAF^{IPNV-LW} a VHSV

Debido a que en el laboratorio teníamos menos experiencia trabajando con células SAF que con EPC, hicimos primero un experimento para ver la susceptibilidad de las células SAF

frente a VHSV. Se sembraron monocapas en una placa de 96 pocillos y se infectaron a diferentes moi con VHSV (0.01, 0.05, 0.1 y 0.5).

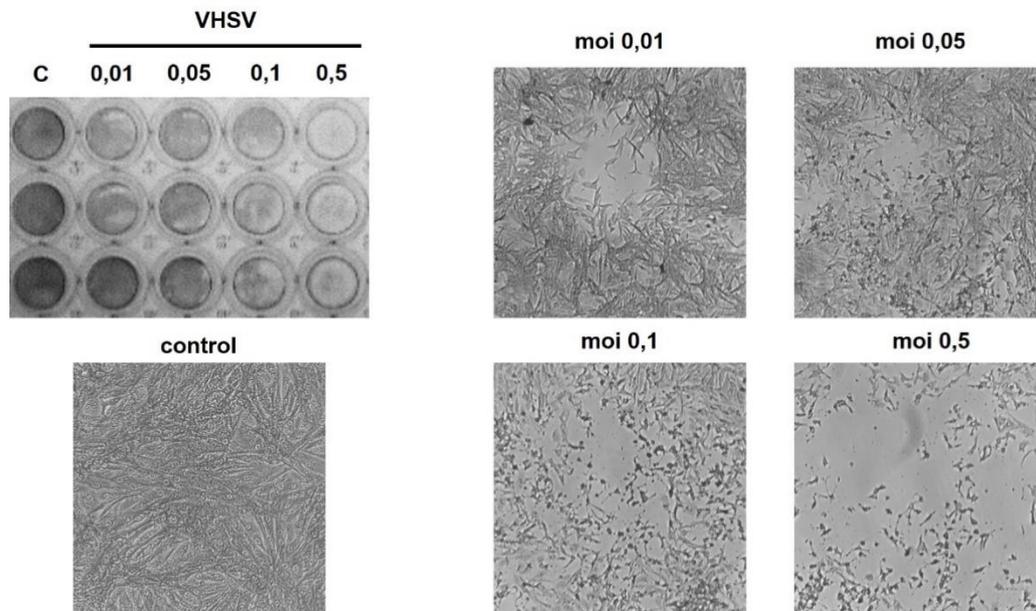


Figura 10. Susceptibilidad de las células SAF frente a la infección por VHSV a diferentes moi (0.01, 0.05, 0.1 y 0.5). Se fijaron las células a los 7 días post-infección con metanol y se tiñeron con Giemsa (5 mg/mL). Fotografías tomadas con microscopio óptico (200X), que muestran el efecto citopático causado por el virus.

Como resultado, se observa que las SAF muestran efecto citopático (**Figura 10**) tras ser infectadas con VHSV a todas las multiplicidades probadas, aunque éstos se ven mejor a partir de una moi de 0.1 virus/célula.

Se generaron también líneas de SAF persistentemente infectadas con las cepas europea (cepa Sp) y americana (cepa LW) de IPNV, pertenecientes a peces del orden de los Perciformes a las que denominamos SAF^{IPNV-Sp} y SAF^{IPNV-LW}. Para ello, infectamos dos botes de 25 cm² de células SAF con el virus IPNV (moi: 0.05 virus/célula). Uno de los botes fue infectado con la cepa Sp del virus y el otro con la cepa LW. Se incubaron los botes a una temperatura de 21 °C, la cual no es óptima ni para las células (25 °C) ni para el virus (14 °C) consiguiendo así que el virus no genere daños severos al cultivo. Aun así, la cepa LW dificulta el crecimiento y causa una cierta mortalidad, lo que impide que lleguen al grado de confluencia de las SAF control. A los 3 días, se retiró el medio de los botes y se realizó un pase a las células.

Para confirmar que las líneas generadas eran, efectivamente, SAF^{IPNV-Sp} y SAF^{IPNV-LW} realizamos un ensayo de formación de calvas. Así pues, se sembró una placa de 24 pocillos con células SAF, SAF^{IPNV-Sp} y SAF^{IPNV-LW} y la infectamos con VHSV (2000 virus/pocillo). Las células estuvieron 90 minutos en contacto con el virus y pasado este tiempo, se retiró el medio de los pocillos y se puso según correspondiera metil celulosa o medio líquido (L-15 10%).

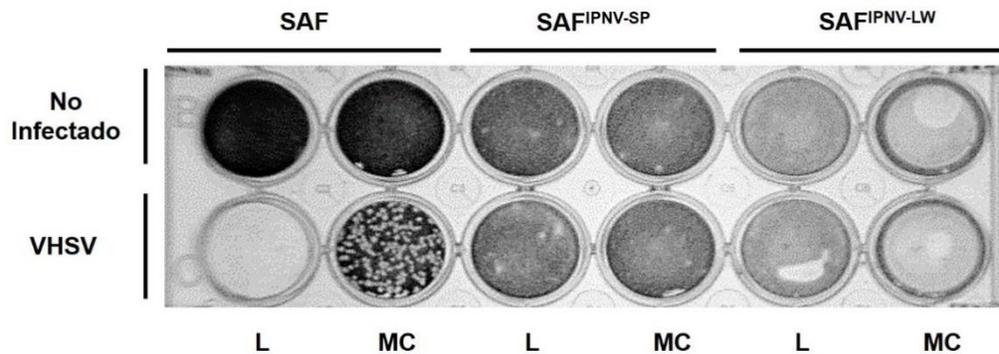


Figura 11. Ensayo de formación de calvas con células SAF, SAF^{IPNV-Sp} y SAF^{IPNV-LW} infectadas con VHSV (2000 virus/pocillo) en metil celulosa (MC) o medio líquido L-15 10% (L). Fueron teñidas a los 7 días post-infección con cristal violeta.

Podemos concluir, viendo los resultados, que las líneas SAF^{IPNV-Sp} y SAF^{IPNV-LW} fueron generadas correctamente (**Figura 11**) debido a que resistieron la superinfección con VHSV, mientras que las células SAF muestran signos de infección como la aparición de calvas en el pocillo de metil celulosa o el pocillo de medio líquido totalmente arrasado. Por tanto, estas líneas generadas serán usadas como tal en experimentos posteriores.

2.2 Resistencia de células SAF^{IPNV-Sp} y SAF^{IPNV-LW} a SVCV

De igual modo que con las líneas EPC^{IPNV-Sp} y EPC^{IPNV-LW} quisimos profundizar más en la resistencia que presentaban las líneas de SAF persistentemente infectadas con las diferentes cepas de IPNV. Por lo que probamos también su resistencia frente a SVCV, que es un virus de la misma familia que el VHSV (*Rhabdoviridae*). Así pues, sembramos una placa de 24 pocillos con células SAF, SAF^{IPNV-Sp} y SAF^{IPNV-LW} y la infectamos con SVCV (500 virus/pocillo).

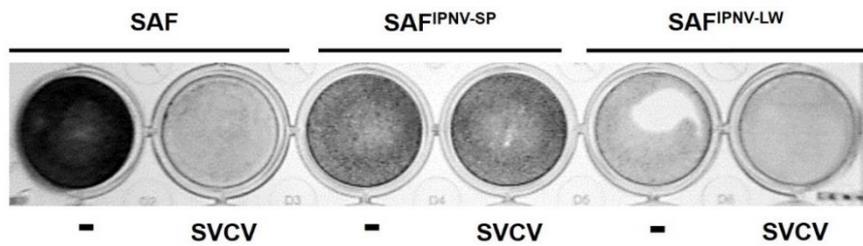


Figura 12. Resistencia de células SAF, SAF^{IPNV-SP} y SAF^{IPNV-LW} frente a infección por SVCV (500 virus/pocillo) en medio líquido. Las células fueron teñidas con cristal violeta a los 5 días post-infección.

De acuerdo con los resultados, las líneas de SAF persistentemente infectadas con las cepas de IPNV muestran también resistencia frente a la infección por SVCV (**Figura 12**), al contrario que las SAF, que son susceptibles al virus. Aquí se comprueba que la presencia del virus en las SAF^{IPNV-LW} impide que formen un tapiz completo, como se ha mencionado anteriormente.

2.3 Actividad antiviral de medios condicionados procedentes de SAF^{IPNV-SP} y SAF^{IPNV-LW} sobre células SAF

También se estudió la actividad de los medios condicionados de las líneas SAF^{IPNV-SP} y SAF^{IPNV-LW} sobre células SAF para ver si ofrecían también resistencia frente a superinfecciones con otros virus (resistencia homóloga). Se sembró una placa de 96 pocillos con células SAF y éstas estuvieron en contacto con los medios condicionados (diluciones 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32) durante 24 horas. Trascorridas estas horas, se retiraron los medios y se infectó la placa con VHSV (moi: 0.01 virus/célula). Las diluciones 1:4 y 1:8 resultaron ser por sí solas tóxicas para las células, por lo que se muestran solamente los resultados de las diluciones 1:16 y 1:32.

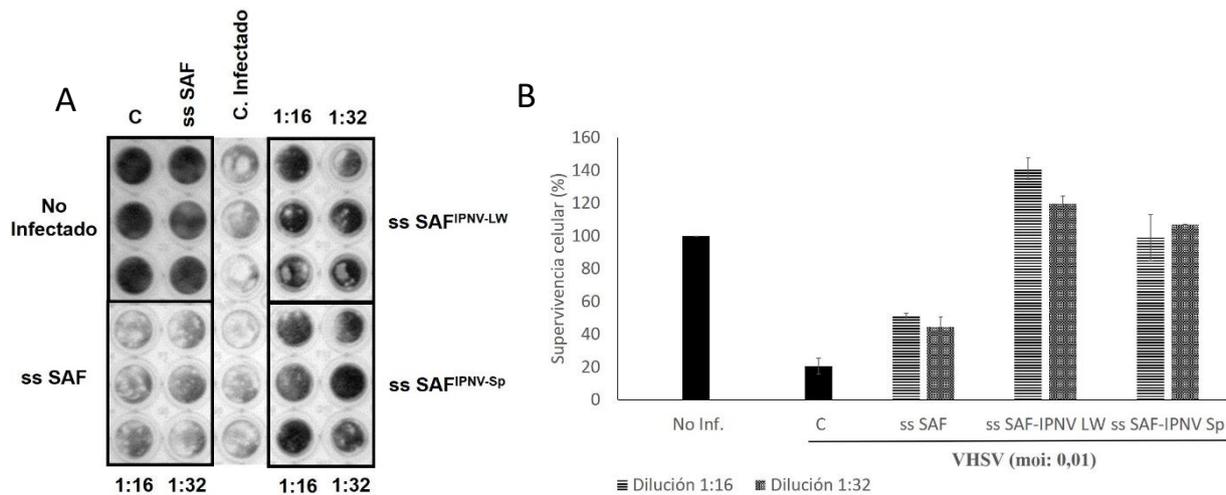


Figura 13A. Células SAF cultivadas durante 24 horas con medio L-15 10% o con medios condicionados (ss) procedentes de cultivos de células SAF, SAF^{IPNV-Sp} y SAF^{IPNV-LW} a diferente dilución. Se infectaron posteriormente con VHSV (moi: 0.01 virus/célula) y se fijaron con metanol a los 6 días post-infección y se tiñeron con Giemsa. **13B.** Supervivencia celular ante infección por VHSV. Medida de la absorbancia a 570 nm y se tomó el 100% de supervivencia celular, la absorbancia media de los pocillos sin infectar.

Obtenemos como resultado que tanto el medio condicionado de SAF^{IPNV-Sp} como el de SAF^{IPNV-LW} ofrecen protección a las células SAF ante la infección por VHSV (**Figura 13**) en las diluciones 1:16 y 1:32. Por el contrario, se observa que el medio condicionado procedente del cultivo de SAF no otorga protección alguna. En el futuro sería interesante probar la actividad de los medios condicionados a diluciones mayores de 1:32.

DISCUSIÓN

1. Introducción

Las enfermedades víricas en peces suponen una gran amenaza en acuicultura por las pérdidas tanto en producción como a nivel económico. Algunos de los virus que mayores pérdidas económicas causan a nivel global en la industria piscícola anualmente en especies de agua dulce son el IPNV, IHNV, ISAV y VHSV (Purcell *et al.*, 2012).

	Nombre completo	Familia	Genoma
IPNV	Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa	<i>Birnaviridae</i>	RNA bicatenario bisegmentado.
IHNV	Virus de la Necrosis Hematopoyética Infecciosa	<i>Rhabdoviridae</i>	RNA monocatenario de polaridad negativa.
ISAV	Virus de la Anemia Infecciosa del Salmón	<i>Orthomyxoviridae</i>	RNA monocatenario de polaridad negativa. Segmentado en 8 fragmentos.
VHSV	Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral	<i>Rhabdoviridae</i>	RNA monocatenario de polaridad negativa.

Tabla 1. Información sobre los virus que mayores pérdidas económicas causan en la industria piscícola a nivel global en peces de agua dulce.

Actualmente, no existen tratamientos eficaces para tratar a los peces infectados y hay muy pocas vacunas disponibles para prevenirlas. Por todo ello, conocer la respuesta inmunitaria de peces frente a virus es de gran importancia para mejorar los tratamientos ya existentes y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas y de vacunación.

La respuesta inmune innata representa una parte muy importante de los mecanismos de defensa que disponen los peces para prevenir la replicación viral después de la infección. Al igual que los mamíferos, los peces disponen del sistema de interferón (IFN) de tipo I, que juega un papel clave en el mecanismo de defensa rápido frente a patógenos. Cuando un receptor de la inmunidad innata (PRR) reconoce un patrón molecular asociado a patógeno (PAMP), como puede ser el RNA de doble cadena que se produce en las infecciones virales, se inicia una cascada de señalización intracelular que resulta en la transcripción y traducción de IFN (Langevin *et al.*, 2013). Esta molécula es secretada al medio y activa la expresión de genes de respuesta a IFN en ella misma y en las células vecinas. Uno de estos genes que está más relacionado con la protección frente a la infección vírica es *mx*, que codifica la proteína de

resistencia a mixovirus (Mx), la cual ha demostrado tener efectos antivirales (DeWitte-Orr *et al.*, 2007; García-Rosado *et al.*, 2008).

2. Fenómeno de interferencia viral

2.1 Fenómeno de interferencia viral en Cipriniformes

En el presente trabajo se ha investigado el fenómeno de interferencia viral, ésta puede ser homóloga o heteróloga. Nos referimos a interferencia viral homóloga si la infección con un virus ofrece protección frente a una segunda infección con ese mismo virus. Cuando se superinfecta con un virus diferente, entonces se habla de interferencia viral heteróloga. En trabajos anteriores (García *et al.*, 2011; Jurado *et al.*, 2013; Parreño *et al.*, 2016) se ha caracterizado una línea celular de EPC persistentemente infectada con la cepa Sp de IPNV (EPC^{IPNV-Sp}), la cual presenta resistencia frente a la superinfección con IPNV^{Sp} (protección homóloga) y con VHSV (protección heteróloga). En estos estudios se observó que esta línea celular mantiene en su medio una concentración constante de partículas víricas durante sucesivos pases a lo largo de varios meses sin que esto afecte a la supervivencia celular. También se demostró que dicho cultivo es resistente a VHSV a una moi de 0.01 virus/célula, por lo que en este trabajo se quiso analizar hasta qué punto conseguían ser resistentes las células EPC^{IPNV-Sp} a superinfecciones con VHSV. Para ello, planteamos un experimento en el que se superinfectaron estas células a multiplicidades de infección crecientes, llegando hasta una moi de 0.5 virus/célula y demostrando que se conseguía la protección frente a VHSV incluso a una moi cincuenta veces mayor.

Lo interesante de los resultados obtenidos *in vitro* es que guardan correlación con frecuencia con lo que sucede *in vivo* en el pez. Por ejemplo, se ha demostrado que peces de la especie *Paralichthys olivaceus* (Fletán japonés) infectados persistentemente con un aquabirnavirus (ABV) son capaces de resistir una segunda infección con VHSV, llegándose a obtener tan solo un 10% de mortalidad a los 7 días post-infección en el grupo de peces experimental (Pakingking *et al.*, 2004). En otro estudio, se demostró que peces de la especie *Solea senegalensis* (lenguado) infectados con IPNV eran resistentes a VHSV y se observó un aumento de la supervivencia de un 50% en comparación con aquellos peces que solo habían sido infectados con VHSV, siendo éste un claro ejemplo de interferencia viral heteróloga (López-Vázquez *et al.*, 2017).

Tras los ejemplos citados, nos preguntamos si la interferencia mediada por IPNV era específica de la cepa Sp (europea) y se decidió probar a realizar experimentos de interferencia

viral con una cepa diferente a ésta de distinto origen geográfico (americana). Para ello, generamos una línea de EPC persistentemente infectada con la cepa LWVRT6o de IPNV (abreviada como cepa LW). Al realizar superinfecciones con VHSV en estas células (EPC^{IPNV-LW}) hasta una moi de 0.5 virus/célula se observó que también eran resistentes al virus, incluso a la multiplicidad de infección más alta. Teniendo en cuenta que ambas líneas celulares (EPC^{IPNV-Sp} y EPC^{IPNV-LW}) presentan a la moi más alta una supervivencia celular cercana al 75%, puede ser que ambas sean capaces de resistir a una infección con cantidades más elevadas de virus que las que se han utilizado en estos experimentos. Por todo ello, se puede decir que la interferencia viral mediada por IPNV no está restringida a la cepa Sp.

Además, la interferencia viral mediada por IPNV no afecta únicamente a superinfecciones con VHSV, sino que también lo hace con SVCV (perteneciente también a la familia *Rhabdoviridae*) como se ha demostrado en varios ensayos de formación de calvas que se realizaron. Se ha probado tanto en las células EPC^{IPNV-Sp} como en las EPC^{IPNV-LW} y en ambas se consiguió frenar la infección por SVCV, en contraposición con las células EPC que fueron susceptibles a ésta. Sería, por tanto, interesante en el futuro comprobar si las células EPC^{IPNV} pudieran ser resistentes a otro virus perteneciente a otra familia. Hay indicios de que IPNV induce protección frente a otros virus como ISAV (Johansen & Sommer, 2001), que pertenece a otra familia (*Orthomyxoviridae*).

Hasta ahora, la interferencia viral la habíamos observado en cultivos persistentemente infectados, eso significa que el primer virus llevaba infectando las células un mínimo de 7 – 8 días antes de la segunda infección. Por otro lado, se quiso comprobar qué ocurría cuando se coinfectaban con dos virus, células que eran susceptibles a infección. Para ello, se planteó un experimento en el que infectamos células EPC con SVCV y posteriormente con IPNV a diferentes tiempos (0, 2 o 4 horas) en el que se obtuvo como resultado que el IPNV no interfería con el SVCV, y por tanto, en nuestro caso el fenómeno de interferencia viral no se observa en coinfecciones o en superinfecciones a corto tiempo. Sin embargo, consultando la bibliografía, algunos autores sí han conseguido demostrar que durante las coinfecciones se den fenómenos de interferencia viral. En estudios con truchas infectadas simultáneamente con IHNV e IPNV (cepa S46), éstas mostraron un 50% menos de mortalidad en comparación con las truchas infectadas únicamente con cualquiera de los dos virus por separado (Alonso *et al.*, 1999). Además, en ese mismo estudio, se realizaron experimentos *in vitro* sobre células BF2 (procedentes de una especie de perciforme como las SAF) donde también se demostró que el IPNV interfería en la replicación de IHNV al ser coinfectadas las células, llegando a tal punto

en el que después de varios pases de las células coinfectadas, el IHNV dejó de ser detectado por RT-PCR.

En investigaciones realizadas previamente en este laboratorio (Jurado *et al.*, 2013) se observó que el medio condicionado de la línea celular EPC^{IPNV-Sp} confería resistencia a los cultivos de EPC infectados con VHSV. En este trabajo, se probaron los medios condicionados de EPC^{IPNV-Sp} y EPC^{IPNV-LW} (inactivándolos previamente con luz UV y sin inactivar) a distintas diluciones sobre células EPC y se analizó si éstos conferían o no resistencia frente a VHSV. Como resultado, se obtuvo que ambos protegían frente a la infección por VHSV cuando no se inactivaban, pero al hacerlo solamente el medio condicionado de las células EPC^{IPNV-Sp} inducía protección a las EPC mientras que el procedente de las EPC^{IPNV-LW} no lo hacía. Esto fue inesperado, ya que se esperaba una protección similar a la que confería el medio condicionado de EPC^{IPNV-Sp}. Los primeros resultados nos indican que debe haber algo en el medio que sea capaz de inducir el estado antiviral. Sin embargo, los resultados obtenidos con los medios condicionados inactivados sugieren que en el medio procedente de EPC^{IPNV-LW} la molécula o moléculas responsables de inducir esa protección frente a la superinfección con VHSV se inactiva también por radiación UV o no se produce en cantidades suficientes. En cualquier caso, sería necesario realizar más experimentos para verificar esta hipótesis.

2.2 Fenómeno de interferencia viral en Perciformes

Queríamos saber si el fenómeno de interferencia viral observado en líneas celulares de ciprínidos (EPC) también se da en líneas de perciformes, que incluyen especies de pez que son económicamente importantes como pueden ser la dorada (*Sparus aurata*) y la lubina (*Dicentrarchus labrax*). Por ello, se analizó el fenómeno de interferencia viral en células SAF (procedentes de dorada). Las células SAF persistentemente infectadas con IPNV (cepa Sp), al igual que las células EPC^{IPNV-Sp}, son resistentes frente a VHSV (Parreño, 2013). Se realizaron ensayos de formación de calvas sobre células tanto SAF^{IPNV-Sp} como SAF^{IPNV-LW} utilizando dos rhabdovirus diferentes (VHSV y SVCV) para comprobar que, efectivamente y como se esperaba, estas células persistentemente infectadas eran resistentes frente a superinfecciones por estos virus. Sin embargo, cabe decir que el VHSV no replica tan bien en las células SAF como en las EPC. Esto, se comprobó realizando un experimento en el que se infectaron las SAF con VHSV a multiplicidades de infección crecientes llegando hasta una moi de 0.5 virus/célula. Comparando dicho experimento con uno que se hizo en EPC bajo las mismas condiciones se vio que a la moi más baja (0.01 virus/célula) las células EPC ya estaban completamente lisadas a los 5 dpi, mientras que las SAF a esa misma moi presentaban efecto

citopático, pero en menor grado que las EPC, incluso a más días post-infección (7 dpi). Por tanto, podemos decir que las SAF^{IPNV-Sp} y SAF^{IPNV-LW} resisten infecciones frente a virus de la familia *Rhabdoviridae* y sería también de gran interés ver si también son resistentes a otros virus pertenecientes a familias diferentes. Cabe mencionar, que las líneas SAF^{IPNV-Sp} y SAF^{IPNV-LW} son más inestables que las EPC^{IPNV-Sp} y EPC^{IPNV-LW}, pudiendo entrar en crisis y morir al cabo de unos pocos pases.

Se analizaron también los medios condicionados procedentes de las líneas celulares de SAF^{IPNV-Sp} y SAF^{IPNV-LW} sobre células SAF para ver si, del mismo modo que ocurre con las líneas de EPC persistentemente infectadas, éstos confieren protección a las células frente a una superinfección con VHSV. Las diluciones 1:4 y 1:8 de dichos medios condicionados resultaron ser tóxicas, probablemente debido a una reactivación del IPNV causante de una infección lítica. Por ello, los resultados se analizaron a partir de la dilución 1:16, en la que el virus estaría lo suficientemente diluido como para no interferir en el ensayo. Según los resultados, los medios condicionados a las diluciones 1:16 y 1:32 sí protegieron a las células SAF de la infección frente a VHSV, por lo que al igual que ocurre con los medios condicionados de EPC^{IPNV-Sp} y EPC^{IPNV-LW} debe haber algo en estos medios que induzca en las células un estado antiviral. En este caso, hubiese sido interesante bajar más allá de la dilución 1:32 para ver así hasta qué punto eran capaces los medios condicionados de conferir protección a las células.

Por último, sería también interesante ver si todo lo que se ha probado *in vitro* en cuanto a interferencia viral, se reproduce también *in vivo* en el pez. De hecho, ya se están llevando a cabo estudios de interferencia *in vivo* en el laboratorio con pez cebra. Concretamente, se está estudiando la interferencia viral entre IPNV y SVCV en estos peces.

CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

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

1. La cepa LWVRT60 de IPNV también induce interferencia.
2. El fenómeno de interferencia viral entre IPNV y SVCV solo se produce en cultivos persistentemente infectados.
3. También se produce interferencia en una línea celular de perciforme (SAF).
4. Los medios condicionados de las células SAF portadoras de IPNV tienen actividad antiviral.

En cuanto a futuros pasos, cabría caracterizar mejor las células SAF^{IPNV-Sp} y SAF^{IPNV-LW} en cuanto a estabilidad y producción de virus, así como los medios condicionados procedentes de éstas probando llegar a diluciones mayores de 1:32 y ver si se mantiene su actividad antiviral. Se podría estudiar la respuesta cruzada entre los medios condicionados de las células EPC persistentemente infectadas con IPNV sobre células SAF y viceversa y comprobar si se da o no una protección cruzada, lo que daría una idea de cómo de conservada está la vía de señalización de interferón en peces. Además, se podría también medir la interferencia viral cuantificando RNA de cada uno de los virus por qPCR. Finalmente, se podría estudiar la interferencia viral *in vivo*, estableciendo infecciones persistentes de IPNV en pez. De hecho, este último punto se está comenzando a hacer en el grupo de investigación utilizando pez cebra, que es una especie de pez perteneciente al orden de los Cipriniformes.

REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA

Ahne, W., Bjorklund, H. V., Essbauer, S., Fijan, N., Kurath, G. and Winton, J. R. 2002. *Spring viremia of carp (SVC)*. Diseases of Aquatic Organisms. 52(3):261-72

Al-Hussinee, L., Lord, S., Stevenson, R. M. W., Casey, R. N., Groocock, G. H., Britt, K. L., Kohler, K. H., Wooster, G. A., Getchell, R. G., Bowser, P. R. and Lumsden, J. S. 2011. *Immunohistochemistry and pathology of multiple Great Lakes fish from mortality events associated with viral hemorrhagic septicaemia virus type IVb*. Diseases of Aquatic Organisms. 93:117-127.

Alonso, M., I. Rodríguez, and S. S. Perez-Prieto. 1999. *Viral coinfection in salmonids: infectious pancreatic necrosis virus interferes with infectious hematopoietic necrosis virus*. Archives of Virology. 144:657-673.

Ballesteros, N., S. Rodríguez, S. I. Pérez-Prieto. 2015. *Immune responses to oral pcDNA-VP2 vaccine in relation to infectious pancreatic necrosis virus carrier state in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss**. Veterinary Immunology and Immunopathology. 165:127-137.

Byrne, N., J. Castric, J. Cabon, and C. Quentel. 2008. *Study of the viral interference between infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)*. Fish Shellfish Immunology. 24:489-497.

Cutrin, J. M., Oliveira, J. G., Barja, J. L. and Dopazo, C. P. 2000. *Diversity of Infectious Pancreatic Necrosis Virus strains isolated from fish, shellfish and other reservoirs in Northwestern Spain*. Applied and Environmental Microbiology. 66(2): 839-843.

DeWitte-Orr, S., J. C. Leong, and N. C. Bols. 2007. *Induction of antiviral genes, *Mx* and *vig-1*, by dsRNA and Chum salmon reovirus in rainbow trout monocyte/macrophage and fibroblasts cell lines*. Fish Shellfish Immunology. 23:670-682.

Gadan, K., A. Sandtro, I. S. Marjara, N. Santi, H. M. Munang'andu, and O. Evensen. 2013. *Stress-induced reversion to virulence of infectious pancreatic necrosis virus in naïve fry of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)*. PLoS ONE 8.

García, I., A. Galiana, A. Falcó, A. Estepa, L. Pérez. 2011. *Characterization of an infectious pancreatic necrosis (IPN) virus carrier cell culture with resistance to superinfection with heterologous viruses*. Veterinary Microbiology. 149: 48-55.

García-Rosado, E., M. Alonso, J. Bejar, M. Manchado, I. Cano, and J. J. Borrego. 2008. *Expression analysis of Mx protein and evaluation of its antiviral activity against sole aquabirnavirus in SAF-1 and TV-1 cell lines.* Vet. Immunology and Immunopathology. 121:123-129.

García-Valtanen, P., Martínez-López, A., López-Muñoz, A., Bello-Perez, M., Medina-Gali, R. M., Ortega-Villaizán. M. M., Varela, M., Figueras, A., Mulero, V., Novoa, B., Estepa, A. and Coll, J. 2017. *Zebra fish lacking adaptive immunity acquire an antiviral alert state characterized by upregulated gene expression of apoptosis, multigene families and interferon-related genes.* Frontiers in Immunology. 8:121

Johansen, L. H. and A.-I. Sommer. 2001. *Infectious pancreatic necrosis virus infection in Atlantic salmon *Salmo salar* post-smolts affects the outcome of secondary infections with infectious salmon anaemia virus or *Vibrio salmonicida*.* Diseases of Aquatic Organisms. 47:109-117.

Julin, K., L. H. Johansen, A.-I. Sommer, and J. B. Jorgensen. 2014. *Persistent infections with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) of different virulence in Atlantic salmon, *Salmo salar*.* Journal of Fish Diseases 38:1005-1019.

Jurado, M. T., P. Garcia-Valtanen, A. Estepa, and L. Perez. 2013. *Antiviral activity produced by an IPNV- carrier EPC cell culture confers resistance to VHSV infection.* Veterinary Microbiology. 166:412-418.

Langevin, C., E. Aleksejeva, G. Passoni, N. Palha, JP. Levraud, and P. Boudinot. 2013. *The antiviral innate immune response in fish: evolution and conservation of the IFN system.* Journal of Molecular Biology. 425:4904-4920.

Lopez-Vazquez, C., M. C. Alonso, C. P. Dopazo, and I. Bandín. 2017. *In vivo study of viral haemorrhagic septicaemia virus and infectious pancreatic necrosis virus coexistence in Senegalese sole (*Solea senegalensis*).* Journal of Fish Diseases 40:1129-1139.

Lorenzen, E., Carstensen, B. and Olesen, N. J. 1999. *Inter-laboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VHSV, IHNV and IPNV.* Diseases of Aquatic Organisms. 37(2):81-88.

Lund, M., M. V. Rosaeg, A. Krasnov, G. Timmerhaus, I. B. Nyman, V. Asperhaug, E. Rimstad, and M. K. Dahle. 2016. *Experimental Piscine orthoreovirus infection mediates protection against pancreas disease in Atlantic salmon (*Salmo salar*).* Veterinary Research. 47:107.

Nylin B. & Olesen N.J. 2001. *Egtvedsyge i tre dambrug. En beskrivelse af dødeligheden og de økonomiske konsekvenser af udbrud af Egtvedsyge i vinteren 2000.* Ferskvandsfiskeribladet. 99, 126–132.

OIE. *Enfermedades, infecciones e infestaciones de la Lista de la OIE en vigor en 2018.* <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2018/>

Pakingking, R., Y. Okinaka, K. Mori, M. Arimoto, K. Muroga, and T. Nakai. 2004. *In vivo and in vitro analysis of the resistance against viral haemorrhagic septicaemia virus in Japanese flounder (Paralichthys olivaceus) preceedingly infected with aquabirnavirus.* Fish & Shellfish Immunology. 17:1-11.

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

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

Purcell, M. K., K. J. Laing, and J. R. Winton. 2012. *Immunity to fish rhabdoviruses.* Viruses 4:140-166.

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

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

Syedbasha M and Egli A. 2017. *Interferon Lambda: Modulating Immunity in Infectious Diseases.* Frontiers in Immunology. 8:119. doi: 10.3389/fimmu.2017.00119

Vendramin, N., A. L. Farias Alencar, T. M. Iburg, M. K. Dahle, O. Wessel, A. B. Olsen, and N. J. Olesen. 2018. *Piscine orthoreovirus infection in Atlantic salmon (Salmo salar) protects against subsequent challenge with infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV).* Veterinary Research. 49:30-doi: 10.1186/s13567-018-0524-z.

Zhang, Y.-B., J. Jiang, Y.-D. Chen, R. Zhu, Y. Shi, Q. Zhang, and J.-F. Gui. 2007. *The innate immune response to grass carp hemorrhagic virus (GCHV) in cultured Carassius auratus blastulae (CAB) cells.* *Developmental & Comparative Immunology.* 31:232-243.

Zou, J. and C. J. Secombes. 2011. *Teleost fish interferons and their role in immunity.* *Developmental & Comparative Immunology.* 35:1376-1387.