

Universidad Miguel Hernández de Elche  
Instituto de biología molecular y celular

Departamento de bioquímica y biología molecular

Área de conocimiento: virología

# Establecimiento de sistemas de co-cultivo celular para el estudio de la respuesta antiviral en líneas celulares de pez

---

Autor: Susana Torres Martínez

Tutor: Luis Pérez García-Estañ

Facultad de ciencias experimentales

Grado en biotecnología (2014-2015)

# Índice de abreviaturas

---

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ARNbc:** Ácido ribonucleico bicatenario

**ARNmc:** Ácido ribonucleico monocatenario

**BF2:** *Bluegill fry*

**CHX:** Cicloheximida

**EPC:** *Epitelioma Populosum Cyprini*

**FAO:** Food and Agriculture Organization of the United Nations

**IL:** Interleucina

**IPNV:** *Infectious Pancreatic Necrosis Virus*

**mARN:** ARN mensajero

**PAMP:** Patrón molecular asociado a los patógenos

**PCR:** *Polimerase Chain Reaction*

**Poli I:C:** Ácido poliinosinadesoxicidilico

**PRR:** Receptor de reconocimiento de patrones

**RPMI:** medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute*

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

**SAF:** *Sparus aurata fibroblast*

**TNF:** *Tumor necrosis factor*

**VHSV:** *Viral Hemorrhagic Septicemia Virus*

## Palabras clave

---

Co-cultivo, IPNV, VHSV, Línea celular EPC, Transwell®, rejilla.

# Resumen

---

Estudios previos demuestran que el virus IPN es capaz de establecer una infección persistente tanto in vivo como in vitro en cultivos de la línea celular EPC. Estos cultivos, que llamamos EPC<sup>IPNV</sup> muestran resistencia a la superinfección con virus heterólogos como el virus de la septicemia hemorrágica vírica, así como la secreción de factores antivirales. En este trabajo se analiza en detalle la inducción de la respuesta antiviral mediante el uso de dos sistemas co-cultivo dónde las células efectoras (EPC<sup>IPNV</sup>) y las células diana (EPC) se cultivan separadamente, y luego se ponen en contacto para estudiar su interacción y examinar la respuesta a la superinfección por VHSV. Mediante el primer sistema basado en rejillas de plástico, hemos observado que células EPC que han sido expuestas a estos efectores presentan una protección contra VHSV. Hemos desarrollado un segundo sistema de co-cultivo denominado *Transwell*<sup>®</sup> dónde las células efectoras están separadas de las células diana por una membrana porosa. Utilizando el co-cultivo en *Transwell*<sup>®</sup> hemos llegado a resultados similares al anterior. Además, medidas de RT-PCR cuantitativa de la expresión de interferón (ifn) y del gen mx en las células efectoras y dianas sugieren una correlación entre el incremento de la respuesta celular inmune innata y la inducción de un estado antiviral.

## Abstract

---

Previous studies showed the IPN virus is able to establish a persistent infection both in vivo and in vitro in EPC cultures. IPNV-persistently-infected fathead minnow EPC cultures (EPC<sup>IPNV</sup>) showed resistance to superinfection with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). In this study we analyze in detail the induction of the antiviral state with the use of two co-culture systems where the effector (IPNV-infected) cells and the target (naïve) cells were cultured separately and later put in contact by sharing the growth medium. The first system is based on plastic cell culture in rectangular chambers which we have noticed that EPC cells that have been exposed either to EPC<sup>IPNV</sup> cells or to polyl:C-treated EPC cells became protected against VHSV challenge. The second system is based on *Transwell*<sup>®</sup> co-culture plates, where the effector (EPC<sup>IPNV</sup>) cells are separated from naïve cells by a porous membrane. This system led to similar results. Moreover real-time RT-PCR measurements of interferon (ifn) and mx gene expression in effector and target cells suggest a correlation between an increased cell innate immune response and the induction on the antiviral state.

# Índice

---

<b>1. Introducción</b>	<b>5</b>
<b>2. Antecedentes y objetivos</b>	<b>9</b>
<b>3. Materiales y Métodos</b>	<b>11</b>
3.1. Cultivos celulares	11
3.1.1. Medios de cultivo	11
3.1.2. Líneas celulares	11
3.2. Virus	12
3.3. Sistemas de co-cultivo	12
3.3.1. Rejillas	12
3.3.2. Transwell®	12
3.4. Tinción de la monocapa celular	13
3.4.1. Tinción con cristal violeta y medida de densidad óptica	13
3.4.2. Tinción de Giemsa	13
3.5. PCR cuantitativa	13
3.5.1. Extracción RNA	13
3.5.2. Retrotranscripción del ARN (RT)	13
3.5.3. PCR EN TIEMPO REAL	14
<b>4. Resultados</b>	<b>15</b>
4.1. Sistemas de co-cultivo celular para estudiar la interacción entre poblaciones celulares	15
4.2. Sistema de co-cultivo en rejillas con cámaras rectangulares	15
4.2.1. Sistema de rejilla	15
4.2.2. Puesta a punto del sistema co-cultivo celular en rejilla	16
4.2.3. Co-cultivo en rejillas de células EPC con EPC <sup>IPNV</sup> y EPC + Poli I:C	18
4.3. Sistema de co-cultivo en cestillos (Transwell®)	19
4.3.1. Sistema Transwell	19
4.3.2. Experimento preliminar de co-cultivo Transwell®	19
4.3.3. Co-cultivo de células EPC con diferentes efectores mediante el sistema Transwell®	20
4.3.4. Inducción de genes de respuesta inmune innata en células EPC expuestas a EPC <sup>IPNV</sup>	21
4.3.5. Variación en los niveles de expresión de Mx e IFN en células EPC co-cultivadas con diferentes efectores	22
4.3.6. Transwell® con células heterólogas BF2/SAF	23
<b>5. Discusión</b>	<b>25</b>
<b>6. Conclusiones y proyección futura</b>	<b>30</b>
<b>7. Referencias</b>	<b>32</b>

# 1. Introducción

---

El pescado sigue siendo uno de los productos alimenticios básicos más comercializados en todo el mundo. La producción piscícola mundial ha crecido enormemente en las últimas cinco décadas equiparándose a la pesca de captura. Prueba de ello es que la contribución de la acuicultura a la producción mundial total de pescado en 2013 llegó a ser del 42,2%, frente al 25,7% en 2000. Según la FAO, la producción acuícola mundial de peces comestibles fue en 2013 de 70,5 millones de toneladas aumentando un 5,8% la producción en 2012.

A pesar de estos datos y de que la industria de la acuicultura siga creciendo año tras año, esta ha de enfrentarse a un problema de índole como son las enfermedades de origen vírico y bacteriano. Un ejemplo se puede encontrar en Chile, donde un brote del virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV) en jaulas de salmón del Atlántico afectó a la producción en 2009 y 2010. Otro ejemplo se puede encontrar en Latino América en la década de los noventa en el que el virus del síndrome de Taura (TSV) así como el IHNV (Virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa) causaron catastróficas y pérdidas multimillonarias en el cultivo de camarón. Como último ejemplo cabe destacar la enfermedad infecciosa llamada necrosis nerviosa viral que es causada por un virus de la familia *Nodaviridae*. Esta es la enfermedad más grave que afecta a la lubina cultivada en jaulas en España.

Con los ejemplos anteriores se deduce por tanto que las enfermedades víricas son una importante amenaza para la acuicultura y de ahí nace el esfuerzo de profundizar en el conocimiento de las bases moleculares del proceso infectivo del virus en peces, en el sistema inmunitario de los peces así como en el desarrollo de vacunas más eficaces. Este trabajo de investigación básica podría suponer la creación de nuevos métodos antivirales con los que combatir las enfermedades causadas por virus reduciendo así las pérdidas ocasionadas.

Generalmente tras la infección viral la enfermedad se propaga con rapidez entre los individuos causando una mortalidad en la población. Sin embargo algunos consiguen sobrevivir a la infección convirtiéndose en portadores del virus. Estos individuos pueden producir virus, y son capaces de sobrevivir un largo periodo de tiempo así como infectar a otros peces ([Bootland, L. M. et al., 1991](#); [Goodwin, A. E. et al., 2012](#)). Los peces persistentemente infectados por el virus suelen presentar resistencia a una reinfección con él, y más raramente con otros virus distintos. Este sistema puede ser replicado en células en cultivo en el laboratorio mediante el establecimiento de una infección persistente ([Ballesteros, N et al., 2015](#); [Rodriguez Saint-Jean, S. et al., 2010](#)). Este fenómeno explicado se conoce como persistencia viral y es consecuencia de un equilibrio que se

establece entre la célula hospedadora y el virus y a pesar de que el virus se siga multiplicando, no produce daño citopático debido a que no perturba ni interfiere con la síntesis de ácidos nucleicos ni proteínas. Además cabe destacar que estudios in vitro demuestran que las células persistentemente infectadas son capaces de producir factores antivirales, que liberados al medio que podrían provocar resistencia de otras células hacia una infección (Jurado et al., 2013).

De los virus conocidos que causan gran cantidad de pérdidas en la industria de la acuicultura destacan IPNV y VHSV. El primero de ellos es el virus de la necrosis pancreática infectiva (IPNV por sus siglas en inglés) y se trata del organismo modelo del género de los aquabirvarus. Es causante de una grave enfermedad que afecta a salmones por todo el mundo. Miembros de la familia *Birnaviridae* poseen un genoma bisegmentado, ARN doble cadena. IPNV es capaz de replicarse en un amplio rango de especies de peces además de salmónidos (Martin Armas, M., et al., 2007). En cultivo celular es capaz de producir una infección lítica con un claro efecto citopático en muchas líneas celulares de trucha, salmón y perca sol (Julin, K. et al., 2014). Entre las líneas celulares en las que es capaz de producir una infección persistente están las EPC (cipriniformes). El cultivo de EPC<sup>IPNV</sup> muestra resistencia de las células a otro virus, VHSV (García et al., 2011). El VHSV es causante de la septicemia hemorrágica viral, una enfermedad sistemática grave de los peces que afecta a por lo menos 50 especies de agua marina y de agua dulce. Miembro del género *Novirhabdovirus* de la familia *Rhabdoviridae*, posee un genoma de una sola cadena de ARN monocatenaria que contiene seis genes, N es la proteína de la nucleocápside, P es una fosfoproteína asociada a la polimerasa, M es la proteína de la matriz, G es la glicoproteína de superficie, NV es una proteína no estructural y L es una polimerasa.

A pesar de que la mayoría de infecciones víricas causan la muerte, algunos peces consiguen resistir a la infección. Este hecho tiene que ver principalmente con la respuesta inmune del pez tanto innata como adquirida. Este trabajo está centrado en la respuesta inmune innata, que es la primera línea de defensa contra las infecciones. Las células responsables de ella poseen receptores PRR (del inglés *pattern recognition receptors*) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos PAMP (del inglés *patogen associate molecular patterns*) y provoca una respuesta celular con el objetivo de detener la infección. En peces existe una red de citoquinas que influyen en la respuesta inmune innata. Estas son proteínas que son secretadas en respuesta al agente externo (en este caso un componente del virus) para protegerse. Pueden también ser secretadas al medio para provocar el mismo efecto en células vecinas.

Dentro de la respuesta inmune innata a infecciones víricas, un mecanismo clave es el sistema del interferón tipo I. Esta citoquina es secretada por las células infectadas en respuesta a antígenos

(productos intermediarios de la replicación viral, ARNbc, otros ácidos nucleicos virales como ARNmc, y también por el poli I:C) que son reconocidos por los receptores tipo toll (TLR) o receptores tipo RIG-1 (RLP) y desencadena a través de la vía JAK-STAT la transcripción de muchos genes, algunos de los cuales codifican proteínas antivirales como es el caso de mx. Los efectos antivirales de esta proteína están demostrados (Fernandez-Trujillo, M. A. et al., 2013; Chen, Y.-M. et al., 2008) aunque no se conoce con exactitud su sistema de acción. Algunos autores apuntan a que Mx interfiere en la replicación vírica ya que se une directamente a las partículas víricas, lo que las marca para ser eliminadas por algún otro sistema (Otto Haller. et al., 2007; Chen, Y.-M. el al., 2008). La cascada de activación de ifn y de la producción de Mx está representada en la figura (1).

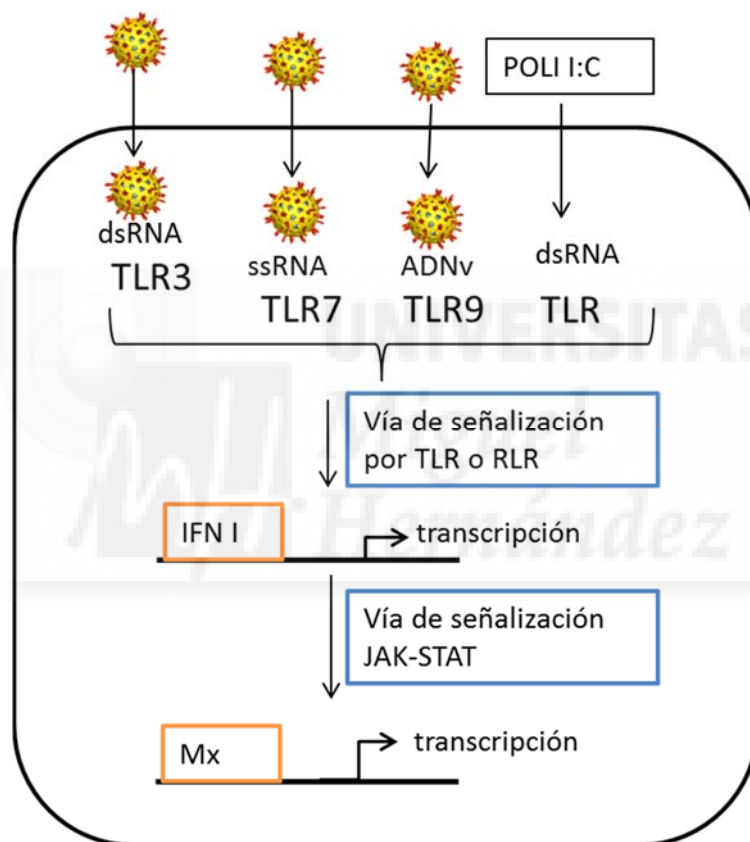


Figura 1. Esquema que muestra la cascada de activación de IFN y Mx.

Entre todas las especies de interés en las que se puede estudiar estos fenómenos de respuesta antiviral y de interferencia viral destaca la línea celular EPC (*epithelioma papulosum cyprini*) procedente de la especie de carpa *Fathead minnow* (Figura 2) (Purcell, M. K. et al., 2012). Perteneciente al género de los Pimephales de la familia de los ciprínidos se ha convertido en una especie modelo para estudiar las infecciones virales en peces. Esta línea celular EPC es susceptible a la infección con varios virus de peces de importancia en acuicultura. Además como se describe en antecedentes posteriormente, es capaz de sobrevivir a una infección persistente con IPNV.

*Pimephales promelas*



*Carpita cabezona*

*Sparus aurata*



Dorada

*Lepomis macrochirus*



Perca sol

Figura 2. Especies de peces de las que proceden las líneas celulares utilizadas en el trabajo



## 2. Antecedentes y objetivos

---

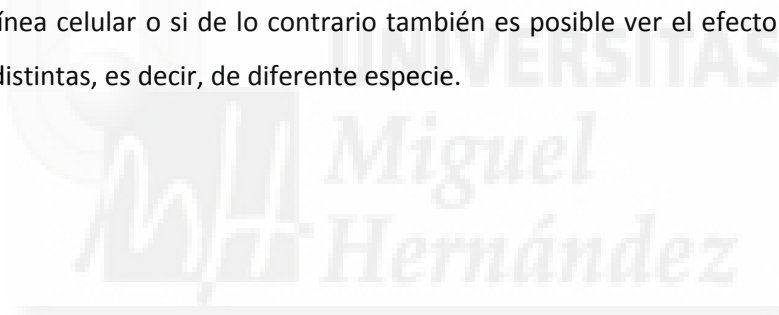
En las investigaciones previas en las que se basa este trabajo ([García I. et al. 2011](#); [Jurado MT. et al. 2013](#)) se logró crear una línea de EPC infectada persistentemente con IPNV que mostraba resistencia a un virus diferente (VHSV), y que secretaba factores antivirales al medio de cultivo. En el primero de los artículos ([García I. et al. 2011](#)) se estableció un estado de persistencia con IPNV en células EPC (nombradas EPC<sup>IPNV</sup>). La elección de estas células se produjo por dos razones. La primera de ellas debido a que esta línea es muy poco susceptible a ser infectada con IPNV con lo que el virus IPN puede establecer una infección sin provocar lisis y muerte celular, produciendo así un estado de persistencia viral. La segunda razón fue la susceptibilidad de EPC frente a rhabdovirus de peces que nos permite investigar la interferencia de IPNV (Birnavirus) a la infección con virus no relacionados. La clave de esta investigación fue descubrir que las EPC<sup>IPNV</sup> mostraban una resistencia mayor a la superinfección con virus heterólogos. Se encontraron niveles significativamente más altos de Mx en EPC<sup>IPNV</sup> que en las EPC originales, lo que era un indicador de la producción de interferón (de tipo I), responsable de restringir la propagación de virus y de mantener un porcentaje bajo de células infectadas persistentemente con IPNV. Evidencias experimentales soportan que el gen IFN tipo I induce un estado antiviral en las células, lo que resulta en una inhibición de la replicación de aquabirnavirus ([García-Rosado et al., 2008](#); [Larsen, R. et al., 2004](#)).

La investigación anterior dejaba un tema de estudio abierto acerca de la interferencia que causa IPNV cuando persiste en las células a la infección con otro virus, por lo que se llevó a cabo, a continuación, otro estudio en el cuál el objetivo era determinar la actividad antiviral del cultivo de EPC<sup>IPNV</sup> frente a la infección con un rhabdovirus como es el VHSV ([Jurado MT. et al. 2013](#)). Por un lado se llegó a la conclusión de que las EPC al ser persistentemente infectadas con IPNV adquirirían resistencia frente a VHSV. Por otro lado, el efecto antiviral del medio condicionado del cultivo de EPC<sup>IPNV</sup> (EPC<sup>IPNV</sup>-MC) fue medido y analizado. Los resultados mostraron que las células EPC que fueron tratadas con el medio condicionado presentaban resistencia a la infección con VHSV lo que indicaba que podría ser debida a que el medio condicionado de EPC<sup>IPNV</sup> contenía factores antivirales solubles de peso molecular menor a 50kDa y con resistencia a pH ácido y tratamiento térmico que inducían a los genes de citoquinas provocando la resistencia de otras células de la misma línea celular. Además, este medio condicionado de EPC<sup>IPNV</sup> era capaz de inducir la sobreexpresión de mx.

Los resultados previos indicaban que la línea de EPC infectada persistentemente con IPNV era capaz de resistir a la infección con VHSV y además liberar factores solubles al medio que inducían un estado antiviral en otras células de la misma línea celular. El planteamiento inicial para este

trabajo fue establecer métodos de co-cultivo celular basados en el uso de dos sistemas: el sistema de rejilla de cámaras rectangulares y un sistema de insertos sobre pocillos conocido como Transwell®. Ambos nos permitirían estudiar la interacción entre dos poblaciones celulares. Con todo ello, los objetivos propuestos para el presente trabajo son los siguientes:

1. Establecer y evaluar la eficacia de un sistema de co-cultivo mediante el sistema de rejillas que permita estudiar la interacción entre la población celular persistentemente infectada con un virus y las células control no infectadas.
2. Establecer y evaluar la eficacia en este caso de un sistema de co-cultivo Transwell® para las líneas celulares de pez que usaremos en el estudio.
3. Ser capaces de cuantificar los niveles de expresión de genes de respuesta inmune innata (mx e ifn), tanto en células diana como en células efectoras.
4. Comparar la utilidad de rejillas y Transwell® con un método de co-cultivo en gotas previamente puesto a punto en el laboratorio.
5. Determinar si la protección sólo se induce en células en co-cultivo entre la misma línea celular o si de lo contrario también es posible ver el efecto en líneas celulares distintas, es decir, de diferente especie.



# 3. Materiales y Métodos

---

## 3.1. Cultivos celulares

### 3.1.1. Medios de cultivo

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento y mantenimiento de las células fue RPMI-1640 Dutch con 20mM HEPES (290 mOsm/Kg) (Gibco BRL-Invitrogen, Barcelona, España), suplementado con un 2% o 10% de suero fetal bovino (SFB, Linus-Cultek, Madrid), 1mM de piruvato sódico (Gibco BRL), 2mM de glutamina (Gibco BRL) y antibióticos (50 µg/ml de gentamicina y 1,2 µg/ml de anfotericina B) (Gibco BRL) (Estepa, A. et al., 1992). En este trabajo dependiendo del porcentaje de suero fetal bovino en disolución se nombra al medio de cultivo como RPMI 10% para el crecimiento celular y 2% para el mantenimiento celular e infecciones. Para el cultivo y el crecimiento de las células BF2 se utiliza el medio de cultivo MEM.

### 3.1.2. Líneas celulares

La línea celular EPC (*Epitelioma Populosum Cyprini*) comprada de la colección europea de cultivos celulares (identificación ECACC nº 93120820) actualmente se cree que fue originada de *Pimephales promelas* de la familia de los ciprínidos, *Cyprinidae* (Winton, J. R. et al., 2010). La línea celular EPC fue mantenida a 25 °C en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> de superficie (~ 7,5 millones de células EPC) en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y en medio RPMI-1640 Dutch. Para subcultivarlas, se utilizó una solución de 0,05% de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich) con el fin de despegarlas de los frascos y se realizaron las diluciones correspondientes con medio de cultivo al volumen necesario para sembrar las nuevas placas.

La línea celular SAF-1 proveniente de fibroblastos de dorada *Sparus aurata* (S.I Perez-Prieto et al., 1999) fue mantenida en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> de superficie (~ 2,5 millones de células SAF) a 21 °C en el mismo medio empleado para las células EPC.

La línea celular BF2 proveniente de fibroblastos de perca sol *Lepomis macrochirus* (Lorenzen et al., 1999) fue mantenida en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> de superficie (~ 2,5 millones de células SAF) a 23 °C en medio MEM.

### 3.2. Virus

El virus de la septicemia hemorrágica vírica (VHSV) empleado en este trabajo fue el VHSV-07.71 aislado en Francia de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Las infecciones se llevan a cabo a 14°C en RPMI 2%.

La cepa de IPNV utilizada para la infección persistente en EPC fue la aislada de trucha IPNV-Sp. Las líneas celulares persistentemente infectadas con IPNV fueron mantenidas a 20°C y en medio RPMI 10%.

### 3.3. Sistemas de co-cultivo

#### 3.3.1. Rejillas

El sistema de co-cultivo basado en rejillas consiste en una placa Petri de 60mm con área de cultivo de 21cm<sup>2</sup> donde se coloca una rejilla compuesta por tres compartimentos rectangulares de 20mm x 10mm adheridos en la placa de Petri.

#### 3.3.2. Transwell®

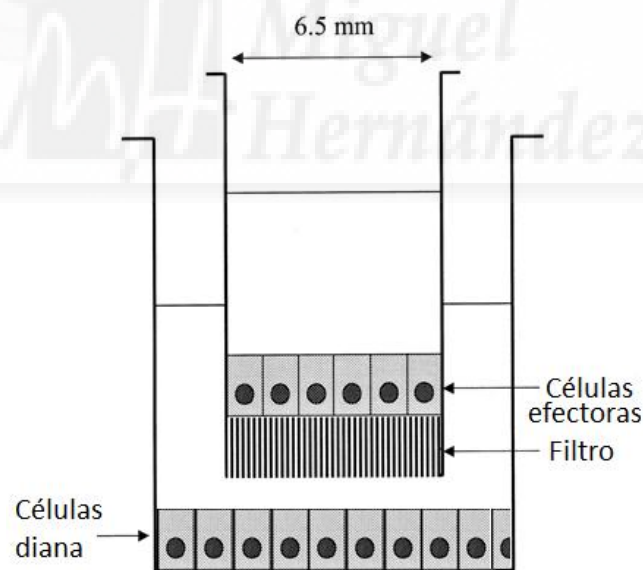


Figura 3. Esquema del sistema de co-cultivo Transwell®

El sistema de co-cultivo basado en Transwell® consiste en una placa de cultivo de 24 pocillos en cuyo fondo presenta cestillos con una membrana permeable cuyo tamaño de poro es de 3µm y un área de cultivo de 0,47cm<sup>2</sup> (Thermo SCIENTIFIC), y que pueden colocarse sobre un pocillo que comparte medio con éste (ver esquema de la figura 3)

### **3.4. Tinción de la monocapa celular**

#### **3.4.1. Tinción con cristal violeta y medida de densidad óptica**

Con el objetivo de evaluar la destrucción de la monocapa causada por la infección viral en los sistemas de co-cultivo, se procede a la coloración con cristal violeta. En este caso se produce la fijación y la tinción de la monocapa celular con 1% de cristal violeta en formaldehído durante 1 h a temperatura ambiente y posterior lavado con agua destilada. A continuación se procede a la captura de imagen con el Gelprinter Basic plus II super.

Además una vez teñida la placa se puede proceder a realizar medidas de densidad óptica a 620nm para estimar la supervivencia celular. Para este procedimiento se disuelven las células teñidas con cristal violeta en 300µl de HCl y se mide en el lector de placas anthos labtec instruments.

#### **3.4.2. Tinción de Giemsa**

Como en el método anterior para determinar la infectividad de VHSV en las células también se produjo la tinción con Giemsa. En este método las células en primer lugar son fijadas durante 15 minutos con metanol 100% y posteriormente teñidas con Giemsa (5 mg/ml x 20 min). A continuación se observan las células con un microscopio de campo claro (Nikon Eclipse TE2000-u; Nikon instruments, inc., NY, USA) y se toman fotografías con una cámara digital (Nikon DS-1QM).

### **3.5. PCR cuantitativa**

#### **3.5.1. Extracción RNA**

Para su realización se cultivaron células en placas de 24 pocillos y se extrajo el ARN total utilizando el kit "Total RNA Isolation System" (Promega) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Posteriormente la concentración total de ARN extraído se determinó midiendo la Absorbancia a 260nm en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo SCIENTIFIC).

#### **3.5.2. Retrotranscripción del ARN (RT)**

A continuación se utilizaron 300 ng de ARN para la obtención de ADNc. En este proceso el ARN se incubó con 0,5 µL de random hexamers (50µM) (Roche) y 1 µl de una mezcla de desoxinucleótidos trifosforilados (dNTPs) por cada 13µl de volumen total durante 5 min a 65 °C. Tras esta incubación se ponen las muestras 1 minuto al hielo y posteriormente se añadieron 4µl de tampón de reacción *first strand buffer* (250 mM TrisHCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 2 µl DTT 0.1 M, 0,5 µl de inhibidor de RNasa y 0,5 µl de transcriptasa inversa (RT) del virus de la leucemia

murina (MMLV RT, Gibco). Se dejó transcurrir la reacción (15 °C x 10 min; 37°C x 50 min; 70°C x 15 min). El ADNc resultante se guardó a -20 °C hasta su uso.

### 3.5.3. PCR EN TIEMPO REAL

Posteriormente tuvo lugar la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) en la cual se utilizaron los siguientes cebadores específicos:

Nombre del cebador Código en GenBank	Secuencias
<b>EPC Mx</b> AY751300.1	FOR 5' – GGAGAAGAGGTTAAATGTGGATCAG – 3' REV 5' – TGACCGAATCAAGAAGTCATTCC – 3'
<b>EPC IFN</b> FN178457.1	FOR 5' – ACAGGCAGTCGTCGGAACCTTA – 3' REV 5' – TGAAGTGCCTTTTTATCTTAATCTCGT – 3'

Las reacciones se llevaron a cabo para cada muestra por triplicado en un volumen final de 20 µl, incluyendo los cebadores requeridos a una concentración de 750 nM cada uno, 2 µl de cDNA procedente de la RT realizada con anterioridad y 10 µL de SYBR® *Universal PCR Master mix* (Applied Biosystems), que contiene SYBR® *Green I Dye*, polimerasa de ADN *AmpliTaq Gold®*, dNTPs con dUTP y componentes del buffer (concentraciones no especificadas por la compañía). Cabe destacar que como control se utiliza el gen endógeno de referencia 18S rRNA cuya reacción se produce con 1,8 µl de mezcla de reacción *Human 18S Rrna (20x) mix* (Life Technologies), 10 µL de TaqMan® *Master mix* (Applied Biosystems) y 2 µl de cDNA diluido 1:100. A continuación la amplificación se lleva a cabo en el GenAmp PCR system 2700 cyler en las siguientes condiciones de amplificación: 2 min a 50 °C, 10 min 95 °C, 40 ciclos (15 seg a 95 °C + 1 min a 60 °C).

El nivel relativo de expresión de los genes analizados se calculó usando el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Para este análisis el gen 18S rRNA se utiliza como gen corrector endógeno. Los principales valores de la expresión relativa de los genes mx e ifn y su desviación estándar se calcularon usando el software Microsoft Excel.

## 4. Resultados

---

### 4.1. Sistemas de co-cultivo celular para estudiar la interacción entre poblaciones celulares

En estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio se había observado que las células EPC provenientes de *Pimephales promelas* (orden cipriniformes) persistentemente infectadas con IPNV (EPC<sup>IPNV</sup>) adquieren resistencia frente a la infección con VHSV, lo que podría estar mediado por ciertos factores responsables de la respuesta inmune innata (Jurado, M. T. et al., 2013). El objetivo de este trabajo era comprobar si las células EPC<sup>IPNV</sup> (células efectoras) eran capaces de inducir un estado antiviral en las células no infectadas EPC (células diana), presumiblemente mediante la producción y secreción de factores al medio. Para realizarlo se pusieron a punto dos sistemas de co-cultivo. El primero de ellos basado en el uso de rejillas con cámaras rectangulares y el segundo en el sistema de co-cultivo *Transwell*<sup>®</sup>.

### 4.2. Sistema de co-cultivo en rejillas con cámaras rectangulares

#### 4.2.1. Sistema de rejilla



**Figura 4. Fotografía del sistema de rejilla sobre placa de 60 mm**

El primer sistema utilizado fue el basado en rejillas con cámaras rectangulares. En la imagen adjunta (figura 4) podemos observar que se basa este sistema de rejilla con tres cámaras rectangulares utilizadas. Este método de cultivo consiste en crecer en el primer compartimento las células diana mientras que separadamente en el tercer compartimento se crecen las células efectoras que van a liberar los factores antivirales al medio. Tras un día de crecimiento separadamente se procede a retirar la rejilla y se ponen en contacto compartiendo el mismo medio.

de cultivo (RPMI 2%). Esto permite que los factores secretados por las células efectoras lleguen a las células diana y comprobar su efecto. Durante estas etapas las células EPC y EPC<sup>IPNV</sup> del experimento se mantienen a 20 - 21 °C. Esta temperatura que no es óptima ni para el virus IPNV ni para las células, permitiendo así que el virus permanezca en el cultivo sin causar daños. Tras estar en contacto durante un día se produce la infección con el virus VHSV a una multiplicidad de infección de 0,01 virus por célula durante 7-8 días. Este método además permite que se puedan crecer dos líneas celulares diferentes en la misma placa compartiendo medio de cultivo sin llegar a contactar entre ellas.

#### **4.2.2. Puesta a punto del sistema co-cultivo celular en rejilla**

El primer ensayo que se llevó a cabo para comprobar la eficacia del sistema de co-cultivo en rejilla se realizó en células homólogas (EPC –EPC<sup>IPNV</sup>). Las células EPC (células diana) fueron co-cultivadas con distintas células efectoras: EPC, EPC<sup>IPNV</sup> y EPC tratadas con poli I:C 20 µg/ml. Poli I:C (inosina: citidina) es un ARN de doble cadena sintético y es conocido como un potente inductor de la respuesta inmune innata (García-Rosado. et al., 2008). Los resultados se muestran en la figura 5. Las células EPC co-cultivadas tanto con EPC<sup>IPNV</sup> como con EPC tratadas con poli I:C mostraron resistencia parcial a VHSV. Por el contrario, en las células EPC co-cultivadas con células EPC se observa deterioro y muerte celular. Esto permite afirmar que la resistencia a VHSV que presentan las células EPC es proporcionada de alguna manera por factores solubles que secretan al medio tanto las EPC<sup>IPNV</sup> como las EPC tratadas con poli I:C, lo que se traduce en un menor efecto citopático en las células diana y mejores resultados por tanto.

Además, para observar con más detalle el efecto citopático causado en las células se tomaron fotografías con el microscopio de campo claro (figura 6). En las EPC control se observa claramente el típico efecto de la infección con VHSV, y como las EPC<sup>IPNV</sup> son resistentes. También se observa que las células EPC co-cultivadas con EPC<sup>IPNV</sup> presentan mayor resistencia que aquellas que no han sido co-cultivadas corroborando por tanto los resultados obtenidos.



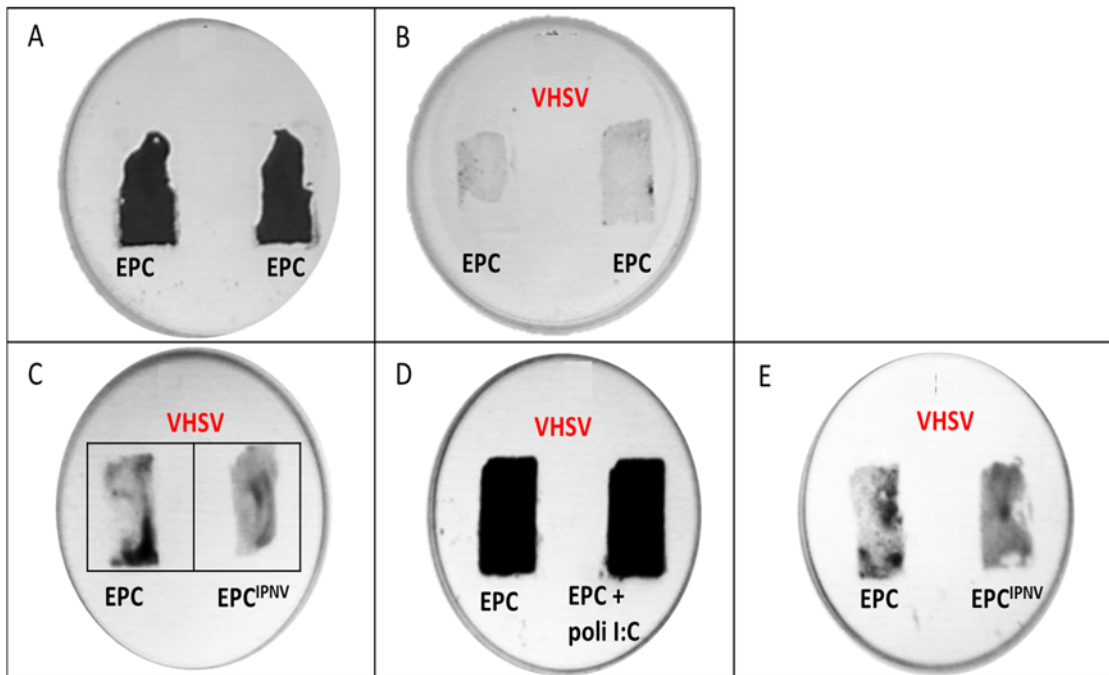


Figura 5. Co-cultivo en rejilla. Resistencia a la infección con VHSV de células EPC con diferentes efectores (EPC, EPC + poli I:C y EPC<sup>IPNV</sup>). (A) Células EPC (como diana y efectoras) sin infectar. (B) Células EPC infectadas. (C) Células EPC y EPC<sup>IPNV</sup> cultivadas separadamente. (D) Células EPC (diana) y EPC tratadas con poli I:C 20µg/ml (efectoras). (E) Células EPC como diana y EPC<sup>IPNV</sup> como efectoras y posteriormente infectadas. Todas las células excepto las de la imagen C se pusieron en contacto durante 24h y posteriormente todas menos la de la imagen A fueron infectadas con VHSV a una m.o.i (multiplicidad de infección) de 0,01 durante 8 días a 14°C. Luego la monocapa de células fue teñida con cristal violeta.

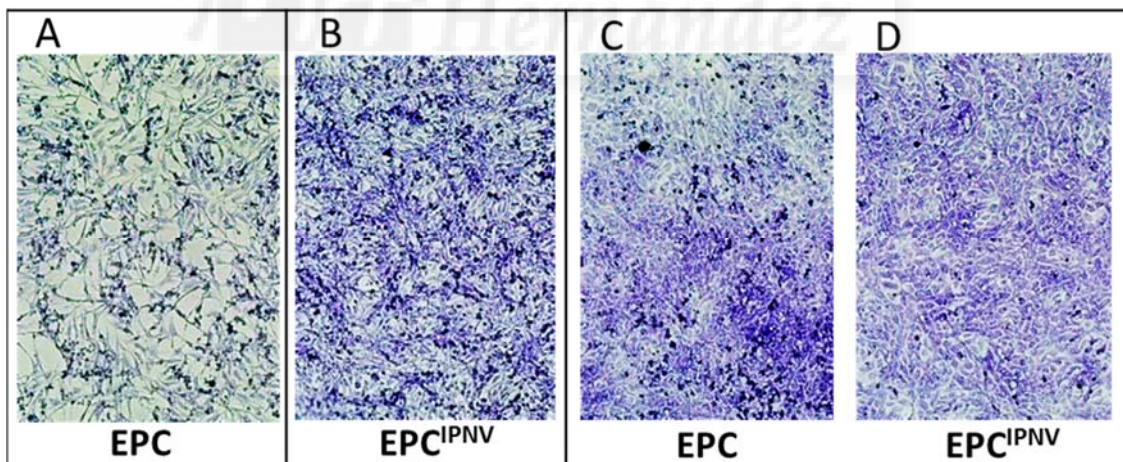


Figura 6. Imágenes de microscopía de campo claro (objetivo 10x) de células infectadas con VHSV y teñidas con cristal violeta. (A) Microfotografía de células EPC crecida separadamente. (B) Células EPC<sup>IPNV</sup> crecidas separadamente. (C) Células EPC diana co-cultivadas junto a EPC<sup>IPNV</sup> efectoras. (D) Células EPC<sup>IPNV</sup> efectoras co-cultivadas junto a EPC diana. Todas ellas fueron infectadas con VHSV a una m.o.i de 0,01 durante 8 días.

#### 4.2.3. Co-cultivo en rejillas de células EPC con EPC<sup>IPNV</sup> y EPC + Poli I:C

Con el objetivo de corroborar los resultados anteriores se llevó a cabo un segundo experimento para comprobar que los resultados con este sistema de rejilla eran reproducibles. En este caso se co-cultivaron al igual que en el caso anterior las EPC (células diana) con EPC<sup>IPNV</sup> (células efectoras). Como control positivo de la respuesta inmune innata se utilizaron EPC + poli I:C 20 µg/ml como células efectoras. Como control se cultivaron las células EPC y las EPC<sup>IPNV</sup> en una misma placa, pero separadas por la rejilla durante todo el experimento (también durante la infección). Los resultados se muestran en la figura 7. De nuevo se comprobó que las EPC co-cultivadas con estas células efectoras eran resistentes a VHSV.

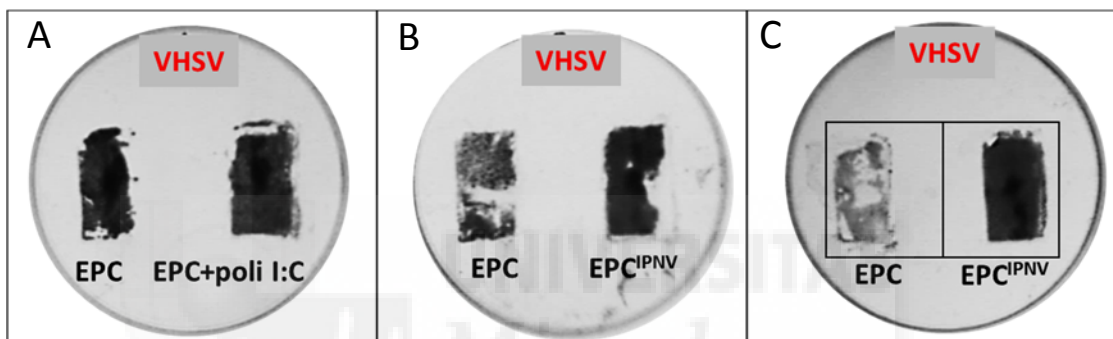


Figura 7. Resistencia de células EPC con diferentes efectores (EPC<sup>IPNV</sup> y EPC + poli I:C) a la infección con VHSV. (A) Células EPC en co-cultivo con células EPC tratadas con poli I:C. (B) Células EPC en co-cultivo con células EPC<sup>IPNV</sup>. Las células se pusieron en contacto durante 24h y todas posteriormente fueron infectadas con VHSV a una m.o.i de 0,01 durante 7 días a 14°C. Luego la monocapa de células fue teñida con cristal violeta. (C) Controles de células EPC y EPC<sup>IPNV</sup> cultivadas e infectadas separadamente.

### 4.3. Sistema de co-cultivo en cestillos (Transwell®)

#### 4.3.1. Sistema Transwell

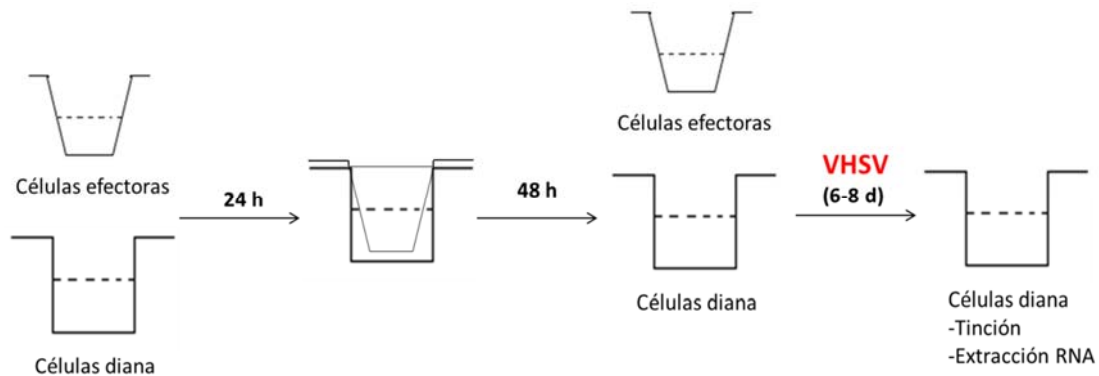


Figura 8. Esquema del protocolo del cultivo en Transwell®

El segundo sistema utilizado fue el basado en Transwell®. Este sistema representado en la imagen (figura 8) consta de una placa con cestillos colocados sobre los pocillos. En los pocillos se cultivan las células diana al 70% mientras que en los cestillos se cultivan las células efectoras que secretan los factores antivirales que pasan a través del fondo del cestillo llegando a las células diana del pocillo al 90%. Se siembran y se dejan crecer las células a 20 °C – 21 °C y tras 24 horas se ponen en contacto simplemente colocando el cestillo con las células efectoras en el pocillo con las células diana en medio RPMI 2%. Pasados dos días en contacto se separa el cestillo del pocillo y se produce la infección de las células del pocillo con el virus VHSV a una multiplicidad de infección de 0,01 virus por célula durante 6-8 días.

#### 4.3.2. Experimento preliminar de co-cultivo Transwell®

El primer paso fue poner a punto el sistema de Transwell® para células (homólogas) (EPC y EPC<sup>IPNV</sup>). El objetivo era determinar si efectivamente las células EPC<sup>IPNV</sup> (células efectoras) eran capaces de secretar factores antivirales que atravesaran la membrana porosa del cestillo y llegaran a las células EPC (células diana) provocando su resistencia a VHSV. Para ello se cultivaron células EPC (infectadas y no infectadas), células EPC<sup>IPNV</sup> (infectadas y no infectadas) y células EPC en co-cultivo con EPC<sup>IPNV</sup> (infectadas). Los resultados se muestran en la figura 9. Se observó que, como era de esperar, las EPC fueron susceptibles a la infección por VHSV (figura 9B), mientras que las EPC<sup>IPNV</sup> eran resistentes (figura 9D). En el caso de las EPC expuestas a las EPC<sup>IPNV</sup>, se indujo un estado de resistencia a VHSV (figura 9E). Esto permite afirmar de nuevo que la resistencia a VHSV es proporcionada por los factores que las células efectoras (EPC<sup>IPNV</sup>) secretan y atraviesan la membrana llegando a las células diana (EPC).

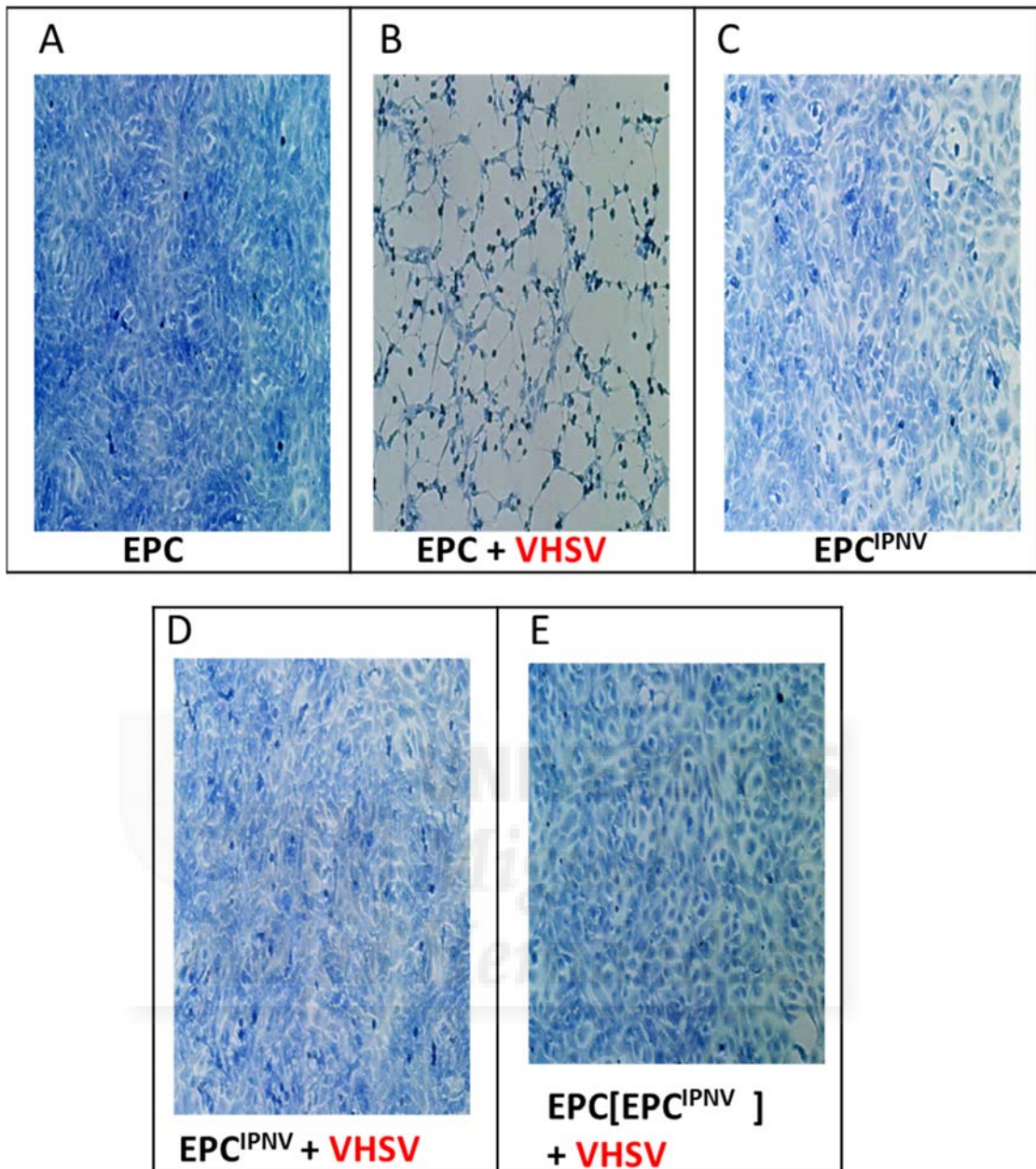


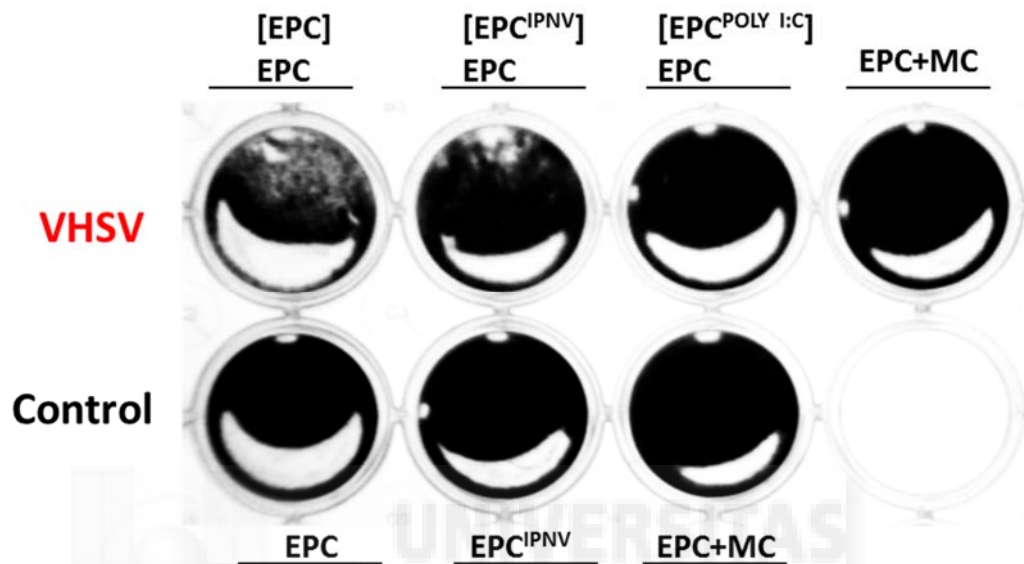
Figura 9. Fotografías tomadas con el microscopio de campo claro (objetivo 10x) teñidas con cristal violeta. (A) Microfotografía de células EPC. (B) Células EPC<sup>IPNV</sup> infectadas con VHSV. (C) Células EPC<sup>IPNV</sup>. (D) Células EPC<sup>IPNV</sup> infectadas con VHSV. (E) Células EPC en el pocillo co-cultivadas con EPC<sup>IPNV</sup> en el cestillo durante 24 horas e infectadas con VHSV durante 8 días.

#### 4.3.3. Co-cultivo de células EPC con diferentes efectores mediante el sistema Transwell®

Una vez comprobado que efectivamente las células EPC co-cultivadas con EPC<sup>IPNV</sup> también en el sistema Transwell® son capaces de sobrevivir a la infección de VHSV se realizó otro experimento en el que además del control negativo de EPC como efectoras, se ensayaron EPC tratadas con poli I:C. También se utilizó medio condicionado (medio procedente del frasco de 25 cm<sup>2</sup> de células de



EPC<sup>IPNV</sup> diluido 1:4). Los resultados indican que tanto las células EPC co-cultivadas con EPC<sup>IPNV</sup> y con EPC tratadas con poli I:C, sufrían un menor efecto citopático (figura 10). También resistían la infección con VHSV las directamente tratadas con medio condicionado. Esto parece indicar que los factores secretados al medio son capaces de atravesar la membrana y provocar la resistencia a VHSV en las células diana.



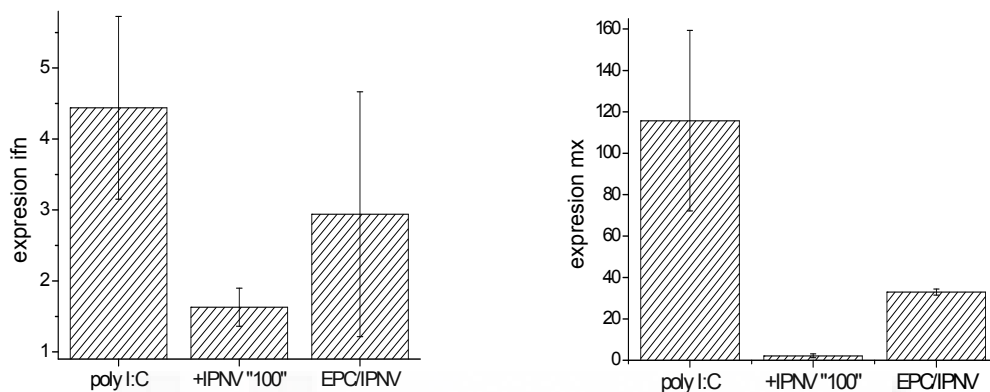
**Fig 10.** Sistema Transwell®. Resistencia de células EPC en co-cultivo con diferentes efectores (EPC, EPC<sup>IPNV</sup>, EPC tratadas con poli I:C y medio condicionado) a la infección con VHSV. Las células en co-cultivo se pusieron en contacto durante 48h excepto las EPC[EPC + poli I:C] que estuvieron 24h. Posteriormente fueron infectadas con VHSV a una m.o.i de 0,01 durante 8 días a 14°C. Finalmente la monocapa de células fue teñida con cristal violeta. Nota: en este experimento se despegaron las células en la pared de la parte inferior de los pocillos.

#### 4.3.4. Inducción de genes de respuesta inmune innata en células EPC expuestas a EPC<sup>IPNV</sup>

Los experimentos anteriores indicaban que las células EPC<sup>IPNV</sup> (células efectoras) eran capaces de secretar factores al medio de cultivo que concedían resistencia frente a VHSV a una línea celular no infectada EPC (célula diana). A continuación se analizó la expresión (mediante RT-qPCR) de mx e ifn ya que son de los genes claves en la respuesta inmune innata en vertebrados. En un primer experimento esta cuantificación se realizó en EPC tratadas con poli I:C y con ~100 partículas víricas de IPNV, y en EPC<sup>IPNV</sup>. Como control de expresión basal se midió también los niveles de estos genes en células EPC sin tratar (que además servía de referencia para la cuantificación relativa).

Los resultados (figura 11) indican que el poli I:C induce la expresión de los genes mx e ifn en EPC. Estos genes también se encuentran inducidos, aunque en menor medida, en las EPC infectadas

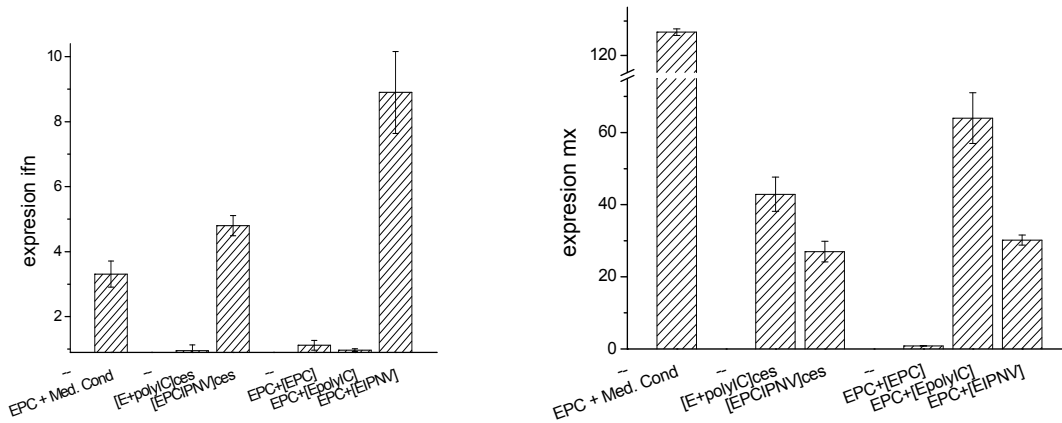
persistentemente con IPNV. Por el contrario no hay expresión de estos genes en EPC que han sido tratadas con ~100 partículas de virus IPNV. Esto permite descartar que sean las partículas de IPNV producidas en EPC<sup>IPNV</sup> las responsables del efecto. Por lo tanto, se deduce de este primer experimento de RT-qPCR que el poli I:C es un buen inductor de la respuesta inmune innata en EPC así como también que la resistencia a VHSV es proporcionada por los factores excretados al medio por las células portadoras y no por el virus IPNV producido por las EPC<sup>IPNV</sup>.



**Fig 11. Análisis mediante RT-qPCR de la expresión de los genes ifn y mx en células EPC tratadas con: poli I:C 20 µg/ml, ~100 virus IPNV y células EPC<sup>IPNV</sup>. El eje Y representa el número de veces que se expresa el gen en relación a EPC control (sin infectar). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de dos experimentos independientes.**

#### **4.3.5. Variación en los niveles de expresión de Mx e IFN en células EPC co-cultivadas con diferentes efectores**

A continuación el objetivo fue comprobar si realmente las células efectoras eran capaces de inducir la respuesta inmune innata de las células diana midiendo en estas la expresión de los genes mx e ifn tras la exposición a las células efectoras. También se realizaron medidas de la expresión de los genes en las células efectoras de los cestillos. Los resultados muestran por una parte que en las células EPC<sup>IPNV</sup> que están en el cestillo hay una expresión tanto de mx como de ifn. Sin embargo en las EPC<sup>poli I:C</sup> del cestillo si hay expresión de mx pero no de ifn. Por otra parte se observa que el tratamiento con medio condicionado induce la expresión de ambos genes en células EPC. Por último, viendo los resultados se concluye que el co-cultivo de células EPC con EPC<sup>IPNV</sup> y con EPC<sup>poli I:C</sup> induce la expresión de los genes mx e ifn (ver figura 12). Por tanto, se podría afirmar que los factores secretados al medio por las células efectoras (EPC<sup>IPNV</sup> y con EPC<sup>poli I:C</sup>) son capaces de inducir una respuesta inmune innata en las células diana (EPC).

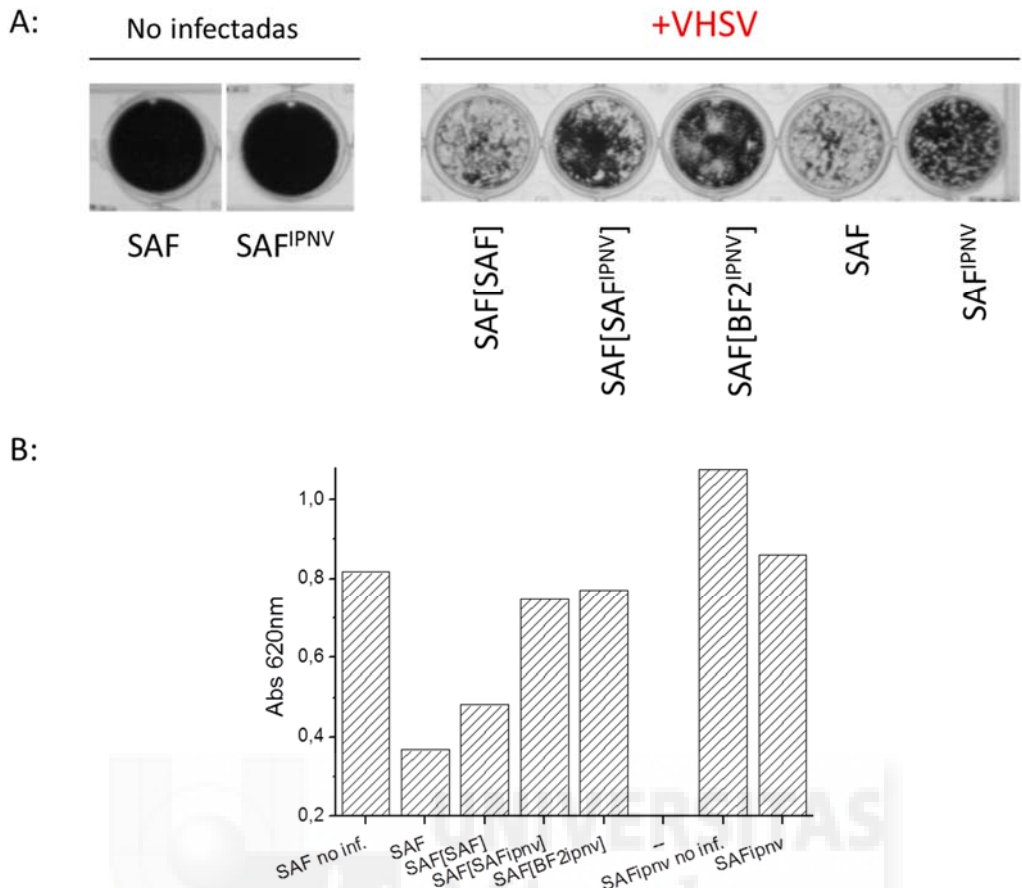


**Fig 12.** Expresión, medida mediante RT-qPCR, de los genes *ifn* y *mx* en células EPC tratadas con medio condicionado de EPC<sup>IPNV</sup>, [EPC<sup>IPNV</sup>] del cestillo, EPC en co-cultivo con [EPC], EPC en co-cultivo con [EPC<sup>poli I:C</sup>], y EPC en co-cultivo con [EPC<sup>IPNV</sup>]. El eje Y representa el número de veces que se expresa el gen en relación a EPC control sin tratar.

#### 4.3.6. Transwell® con células heterólogas BF2/SAF

Una vez comprobado que una línea celular persistentemente infectada concede resistencia frente a VHSV a una línea celular no infectada de la misma especie se quiso comprobar si ocurría lo mismo en células que pertenecían al mismo orden de peces pero eran de distinta especie. Al no disponer de otra línea celular de cipriniforme que enfrentar a las EPC, se utilizaron las células BF2 (*Lepomis macrochirus*) y SAF (*Sparus aurata fibroblast*) ambas especies del orden Perciformes (pero distinta especie). Para realizar este experimento se cultivaron células SAF y SAF<sup>IPNV</sup> controles sin infectar e infectadas. Por otro lado se llevaron a cabo una serie de combinaciones. Manteniendo las SAF como células diana, se utilizaron como efectores SAF<sup>IPNV</sup>, SAF y BF2<sup>IPNV</sup>. Los resultados se muestran en la figura 13A. Las SAF co-cultivadas con SAF<sup>IPNV</sup> y BF2<sup>IPNV</sup> presentan resistencia parcial a VHSV a diferencia de las SAF control infectadas y las SAF co-cultivadas con SAF. Una vez más, es necesaria la presencia de IPNV en las células efectoras para observar algún efecto protector.

A continuación para determinar la supervivencia celular se midió la densidad óptica. Los datos se muestran en la figura 13B. Las células que no fueron infectadas lógicamente presentan los valores de absorbancia más altos, lo que indica mayor supervivencia. En cuanto a las células infectadas con VHSV, las células SAF en co-cultivo con SAF presentaban los valores de absorbancia más bajos, lo que indica muerte celular, y por el contrario las SAF en co-cultivo tanto con SAF<sup>IPNV</sup> como con BF2<sup>IPNV</sup> presentan niveles de absorbancia mayores. Esto parece indicar que células portadoras de IPNV de distinta especie pueden inducir un estado antiviral en las de dorada.



**Figura 13. (A) Sistema Transwell® heterólogo. Resistencia a VHSV de células SAF en co-cultivo con diferentes efectores (SAF, SAF<sup>IPNV</sup>, BF2<sup>IPNV</sup>). Las células en co-cultivo se pusieron en contacto durante 48h y posteriormente fueron infectadas con VHSV a una m.o.i de 0,01 durante 8 días a 14°C. Luego la monocapa de células fue teñida con cristal violeta. (B) Medida de densidad óptica a 620nm en las monocapas de las células diana.**

Finalmente se realizó un experimento (no mostrado) de Transwell® heterólogo entre líneas celulares de especies no relacionadas (cipriniforme/perciforme) (EPC/SAF) donde no esperaríamos que se produjera protección, pero el resultado no fue concluyente.



## 5. Discusión

---

El estado de infección persistente se trata de un estado de equilibrio que se establece entre la célula hospedadora y el virus, el cuál no produce efectos citopáticos en las células, aunque sí que hay producción de virus, pero considerablemente menor que en caso de las infecciones líticas. Se ha descrito que IPNV es capaz de establecer una infección persistente en algunas especies de pez (Munro, E. S. et al., 2006; Polinski, M. P. et al., 2010). En estos casos una infección persistente supone que las células sobrevivan y no sólo sean resistentes a la infección por IPNV sino que resisten a la infección con otros virus lo que se denomina interferencia viral (N. Byrne. et al., 2008). Este estado de infección persistente ha sido caracterizado en la línea celular EPC (García, I. et al., 2011) mediante el cultivo de estas células y la infección con IPNV a una temperatura de entre 20 -21°C.

A partir de esta investigación y con la pregunta abierta de cómo estas células llamadas EPC<sup>IPNV</sup> eran capaces de resistir a virus homólogos así como a virus heterólogos se propuso analizar y determinar en detalle el efecto antiviral inducido por las EPC portadoras de IPNV (Jurado MT et al., 2013). Se tomó sobrenadante de las EPC<sup>IPNV</sup> y se cultivaron células EPC con este medio (medio condicionado EPC<sup>IPNV</sup>). Los resultados indicaron que las EPC cultivadas con este medio de cultivo también adquirirían resistencia a la superinfección con VHSV, lo que sugirió que las células EPC podrían estar secretando algún factor antiviral soluble que indujese la protección frente a VHSV en otras células de la misma línea celular. En la determinación de la expresión de genes involucrados en la inducción de resistencia frente a VHSV se observó que en EPC<sup>IPNV</sup> se sobreexpresaba el gen mx al contrario de otros genes como IL-1, IL-3, IL-10 (García, I. et al., 2011). Además según los resultados experimentales el causante de la activación de la expresión del gen mx podría ser ifn, lo que concuerda con otros artículos que establecen que mx es un gen inducible por ifn (DeWitte-Orr, S. et al. 2007; Chen, Y.-M. et al., 2014).

Con lo anteriormente mencionado, uno de los sistemas que pensamos que podría ser útil para comprobar si realmente las células EPC<sup>IPNV</sup> secretan algún factor que permitiera a otras células resistir la infección con un virus heterólogo es el sistema de co-cultivo. En cualquier de los sistemas de co-cultivo utilizados se cultivan dos líneas celulares que comparten el mismo medio pero no llegan a mezclarse entre ellas, lo que nos permite estudiar la secreción de factores antivirales (citocinas, interferón) al medio, y observar el efecto que tienen en las células diana: en primer lugar, evaluando la supervivencia celular; y en segundo lugar, midiendo la expresión de los genes implicados en la respuesta inmune innata tanto en células efectoras como en las diana.

El primer sistema de co-cultivo utilizado en nuestro laboratorio fue el sistema en gotas ([Congreso de Málaga, 2014](#)) que consistía en tomar un determinado número de células de una línea celular efectora suspendida en medio y colocarlas formando una gota en el lado del pocillo de 35 mm de diámetro. Al lado se realiza el mismo proceso para el crecimiento de las células diana una vez las células se adhieren al plástico de la placa. Este sistema presenta la ventaja de que se puedan crecer dos líneas celulares distintas en el mismo pocillo compartiendo medio sin que lleguen a mezclarse y así poder estudiar si una línea persistentemente infectada confiere resistencia frente a VHSV a una línea celular no infectada sólo mediante los factores excretados al medio de cultivo. Pero este sistema presenta varios inconvenientes que hacen que no sea totalmente idóneo para el estudio que se lleva a cabo. Por una parte este sistema requiere un volumen > 1 ml para cubrir las células en la placa lo que supone un gasto importante de medio de cultivo y de reactivos, y por otra parte este sistema dificulta la extracción de ARN por separado de las células efectoras y diana para estudiar los genes implicados en la respuesta inmune, ya que las dos “gotas” de células no están separadas físicamente.

Ante esta situación optamos en este trabajo de experimentación por poner a punto otro sistema de co-cultivo que se basaba en colocar una rejilla rectangular con tres compartimentos en una placa de 60 mm, tal y como se mostró en la figura 4. Este sistema lo utilizamos con células EPC y como ya se vió en los resultados resultó útil para el estudio de la resistencia que presentan las células diana no infectadas a VHSV cuando se co-cultivan compartiendo el mismo medio con células efectoras EPC<sup>IPNV</sup> o EPC + Poli I:C. Se pudo comprobar por un lado, que efectivamente, como ya otros autores había afirmado que las EPC<sup>IPNV</sup> (células efectoras) secretan factores que provocan resistencia de las células EPC (células diana) a la infección con VHSV, al menos parcialmente ([Jurado MT et al., 2013](#)). Por otro lado, también se pudo ver que las células EPC tratadas con poli I:C resistían a la infección con VHSV además de secretar factores antivirales que inducían protección a las células EPC diana, disminuyendo el efecto citopático. Otros autores ya habían demostrado el efecto protector del tratamiento con poli I:C en otras líneas celulares de pez ([Adamek, M. et al., 2012](#); [Zou, J. et al., 2014](#)). Con este sistema se resuelve uno de los problemas que presentaba el sistema de gotas respecto a la extracción de ARN. Aquí se puede realizar una extracción sin peligro de contaminación de una línea celular a otra ya que a la hora recoger la monocapa celular la propia rejilla mantiene las células separadas. Esta extracción no se muestra en los resultados pero sí se realizó en el laboratorio dando un rendimiento aceptable. A pesar de solucionar uno de los problemas que presentaban el sistema de co-cultivo en gotas, de nuevo seguían existiendo algunos inconvenientes. El primero, el problema del gran consumo de medio de cultivo para el crecimiento y mantenimiento de las células, al utilizarse placas de 60mm de diámetro, lo que supone un gasto económico importante. El

segundo, que permite pocos puntos experimentales por ensayo, ya que la rejilla solo contiene tres compartimentos rectangulares de los cuales dos son utilizados para que las células estén suficientemente separadas y disponemos de un número limitado de rejillas.

Para intentar solventar los problemas que tanto en sistema de co-cultivo en gotas como el de rejillas presentaban nos planteamos finalmente utilizar el sistema Transwell®, que previamente ya habían utilizado otros autores (Chen, Q. Y. et al., 2010; Trottier, C. et al., 2009). El primero de los artículos (Chen, Q. Y. et al., 2010) tenía como objetivo determinar si un activador de los factores reguladores de interferón dependiente de ADN (DAI) inhiben la replicación del virus de la hepatitis B (HBV) y cuál es el mecanismo y para ello utilizaron el sistema Transwell® para crecer las células transfectadas con DAI (células efectoras) y células transfectadas con replicón de HBV (células diana). Como conclusión vieron que la inhibición causada por DAI debía ser intracelular ya que en Transwell® no inhibe HBV. El segundo de los artículos (Trottier, C. et al., 2009) utilizan el co-cultivo Transwell® para ver el efecto de las células MeV+ATRA (measles virus + ácido retinoico) sobre el control. Con estos antecedentes decidimos probar el sistema Transwell para estudiar la respuesta antiviral en la línea celular EPC (células diana) frente a diferentes efectores. Este sistema presenta ciertas ventajas con respecto a los anteriores ya que como hemos podido comprobar las células crecen bien tanto en el cestillo como en el pocillo, y nos permite poner en contacto unas células con otras simplemente insertando el cestillo (efectoras) en el pocillo donde hemos cultivado las células diana permitiéndonos estudiar la resistencia viral de las células diana a VHSV cuando se co-cultivan con células EPC<sup>IPNV</sup> y EPC tratadas con poli I:C. Con los resultados podemos afirmar que los factores solubles antivirales que secretan las células efectoras son capaces de atravesar el poro de la membrana del cestillo y llegar a las células diana. Además este sistema nos permite tener varios puntos experimentales al utilizarse placas que contienen 24 pocillos y 12 cestillos. Otra ventaja es que al trabajar en pocillos (19 mm  $\varnothing$ ) ello nos permite disminuir el gasto de medio de cultivo para cada experimento, respecto al sistema de rejilla con cámaras rectangulares (60 mm  $\varnothing$  por punto).

Otro aspecto en el que el sistema Transwell® es superior, es porque nos permite estudiar fácilmente la posible inducción de genes implicados en la respuesta antiviral especialmente en las células diana. En varios artículos (Yi-Bing Zhang, Jian-Fang Gui., 2012) se asume que la expresión de Mx está regulada por la acción de IFN que se expresa sólo ante la detección de un patógeno. Sin embargo esta afirmación no ha sido comprobada y aún no se sabe con certeza que sea así en otros casos. En este estudio a través del sistema Transwell® se midió la expresión tanto de mx como de ifn en células EPC tratadas con poli I:C (que induce la expresión de mx) y EPC tratadas con MC (medio condicionado del sobrenadante de EPC<sup>IPNV</sup>) y mostraron altos niveles de expresión de mx así como también una alta expresión de ifn. Este resultado podría indicar que de alguna forma la expresión de

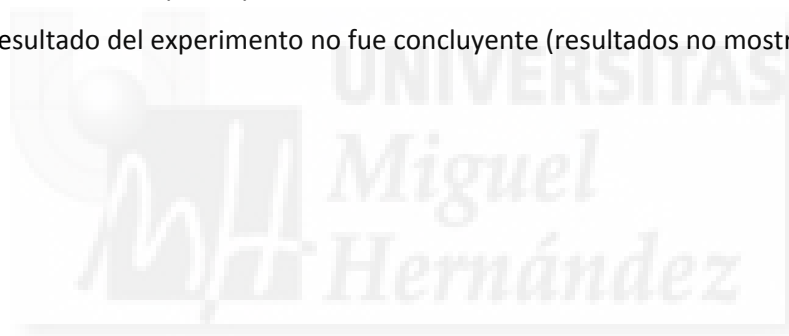
mx está regulada por IFN como otros autores ya apuntaban (Chen, Y.-M. et al., 2014; Zou, J. and C. J. Secombes., 2011). Además con este experimento también se demuestra que el poli I:C es capaz de inducir los genes (mx e ifn) que participan en la respuesta inmune innata y provocar que las células efectoras resistan a la infección de VHSV además de secretar factores solubles al medio capaces de inducir un estado antiviral en las células EPC diana, confirmando lo que otros autores había comprobado (Chang, M.-X. et al., 2013; Tafalla, C. et al., 2007; Vo, N. T. K. et al., 2015). Por el contrario, los resultados que obtenemos de la expresión de genes de mx e ifn en EPC en co-cultivo (células diana) con EPC tratadas con poli I:C y EPC con MC (medio condicionado) parecen indicar que la expresión de Mx podría no ser completamente dependiente de IFN ya que en estas EPC que han recibido los factores antivirales de las células efectoras se inducen los genes del sistema inmune observando una expresión elevada de mx pero no de ifn (especialmente en el caso de las EPC tratadas con poli I:C). Este es un resultado que deberá ser corroborado en futuros experimentos, aunque es perfectamente posible que existan rutas alternativas de señalización intracelular que activan su expresión en ausencia de IFN (Kileng, O. et al., 2007). Lo que sí se puede concluir claramente es que la expresión de interferón (ifn) y del gen mx en las células efectoras y dianas sugiere una correlación entre el incremento de la respuesta inmune innata celular y la inducción de un estado antiviral. Respecto a las células EPC en co-cultivo con EPC<sup>IPNV</sup> también se observa expresión de ifn y mx pero menor que cuando se co-cultivan con EPC<sup>poli I:C</sup> lo que se correlaciona con una resistencia parcial, aunque tampoco descartamos el hecho de que el soporte poroso sobre el que están las EPC<sup>IPNV</sup> del cestillo no sea el óptimo para el mantenimiento y la producción por tanto de los factores antivirales.

Cabe destacar que células EPC tratadas con MC presentan niveles de expresión de estos genes mayores que en las EPC co-cultivadas con EPC<sup>IPNV</sup>. Esto podría explicado por un lado, porque las EPC se crecen directamente con el medio condicionado, al contrario de las EPC co-cultivadas con EPC<sup>IPNV</sup>. Por otro lado este medio condicionado proviene de un frasco de cultivo en el que han estado creciendo las EPC<sup>IPNV</sup> durante  $\geq 5$  días, por lo que los factores secretados al medio pueden alcanzar mayor concentración que los que secretan las EPC<sup>IPNV</sup> mantenidas durante un solo día en el cestillo. Por último cabe realizar una observación: mientras que el gen mx se induce del orden de 100 veces, es frecuente que el gen de ifn se induzca sólo del orden de 5 veces, con lo que resulta más complicado extraer conclusiones definitivas. Esta baja inducción de ifn ya ha sido descrita por otros autores anteriormente (Skjesol, A. et al., 2011; Kileng, O. et al., 2007).

En cuanto a los inconvenientes que presenta el sistema Transwell® destacan el coste del sistema ya que las placas Transwell® tiene un coste superior a las placas de 24 pocillos normales. Cabe destacar otro inconveniente de menor importancia en cuanto a los cestillos y es que las células

efectoras crecidas en ellos no se observan al microscopio, debido posiblemente que la membrana porosa del cestillo no es de un material totalmente transparente a la luz.

Hasta ahora, los estudios se habían realizado siendo células efectoras y diana de la misma especie (EPC, *Pimephales promelas*). Quisimos comprobar si también sucedía entre células de distinta especie de pez, pero relacionadas. Al no tener establecida otra línea celular procedente de un pez de cipriniforme persistentemente infectada con IPNV no utilizamos la línea celular EPC. Sí habíamos podido establecer en el laboratorio dos cultivos portadores de IPNV de dos especies perciformes, SAF (*Sparus aurata*) y BF-2 (*Lepomis machochirus*). Lo que pudimos comprobar es que efectivamente las células SAF presentaban un menor daño citopático a la infección con VHSV que las control, cuando fueron co-cultivadas tanto con SAF<sup>IPNV</sup> (esperado) como con BF2<sup>IPNV</sup> lo que parece indicar por tanto que los factores antivirales por una línea celular es capaz de provocar resistencia viral a una línea celular de una especie relacionada que pertenece al mismo orden. Habiendo comprobado esto quisimos ir más allá y determinar si este efecto también se podía observar co-cultivando células esta vez de peces pertenecientes a distinto orden, donde no cabría esperar efecto alguno, pero el resultado del experimento no fue concluyente (resultados no mostrados).



## 6. Conclusiones y proyección futura

---

Las conclusiones que se pueden obtener de los sistemas co-cultivo empleados en este trabajo son las siguientes:

- 1) El sistema de rejilla con cámaras rectangulares presenta como ventaja que las células efectoras crecen en condiciones óptimas (fijadas al plástico), y que permite la extracción de ARN independiente de células efectoras y diana. Como inconveniente, requiere mayor gasto de medio y se obtienen un escaso número de puntos experimentales.
- 2) El sistema de Transwell® presenta varias ventajas como la extracción independiente de ARN, el menor gasto de medio que el sistema en rejilla y un mayor número de puntos experimentales. Tiene como inconvenientes el alto coste de las placas, y el crecimiento subóptimo de las células efectoras sobre la membrana porosa del cestillo.
- 3) Las células persistentemente infectadas con IPNV inducen un estado antiviral en células de la misma especie, o de otra relacionada.
- 4) La inducción del estado antiviral está mediada por la potenciación de la respuesta inmune innata en las células diana, a través de factores solubles, y parece estar ligada a la sobreexpresión de mx en las células efectoras.

Una vez sacadas las conclusiones se pueden plantear futuros pasos a realizar. Estos se desarrollan a continuación:

- a) Verificar la reproducibilidad y fiabilidad de los resultados de los experimentos repitiéndolos y utilizando más rejillas y Transwell®.
- b) Resolver algunas discrepancias encontradas en las que se observa inducción de mx sin inducción previa de ifn, mejorando la cuantificación mediante el uso de oligo dT's en la RT.
- c) Analizar la interacción entre líneas celulares de especies pertenecientes a grupos distintos de peces.
- d) Establecer la duración del efecto antiviral una vez retirado el estímulo y estudiar en más profundidad el fenómeno.

## **Comentario final**

Parte de los resultados incluidos en esta memoria serán presentados en el Congreso *17th Interantional Conference on Disease of Fish and Shellfish* a celebrar en las Palmas en la comunicación: IPNV persistently infected cells induce protection in naïve cells against VHSV. A co-culture system study. S. Torres, R. Parreño, L. Almagro, A. Estepa y L. Perez. 2015.

## **Agradecimientos**

Quisiera agradecer a Beatriz Bonmatí, técnico del laboratorio, por la preparación de medios de cultivo utilizados en este trabajo. Al Dr. Miguel Saceda por proporcionarnos las placas de Transwell® y el material para realizar los experimentos de rejillas.



## 7. Referencias

---

- Adamek, M., K. Rakus, J. Chyb, G. Brodgen, A. Huebner, I. Irnazarow, and D. Steinhagen.** 2012. Interferon type I responses to virus infections in carp cells: *In vitro* studies on Cyprinid herpesvirus 3 and *Rhabdovirus carpio* infections. *Fish Shellfish Immunol.*
- Ballesteros, N., S. Rodriguez Saint-Jean, and S. I. Perez-Prieto.** 2015. Immune responses to oral pcDNA-VP2 vaccine in relation to infectious pancreatic necrosis virus carrier state in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **165**:127-137
- Bootland, L. M., P. Dobos, and R. M. W. Stevenson.** 1991. The IPNV carrier state and demonstration of vertical transmission in experimentally infected brook trout. *Dis. Aquat. Org.* **10**:13-21
- Chang, M.-X., J. Zou, P. Nie, B. Huang, Z. Yu, B. Collet, and C. J. Secombes.** 2013. Intracellular interferons in fish: a unique means to combat viral infection. *PLoS Pathog.* **9**:e1003736 Ref ID: 612
- Chen, Q. Y., Y. H. Liu, J. H. Li, Z. K. Wang, J. X. Liu, and Z. H. Yuan.** 2012. DNA-dependent activator of interferon-regulatory factors inhibits hepatitis B virus replication. *World J. Gastroenterol.* **18**:2850-2858
- Chen, Y.-M., Y.-L. Su, P.-S. Shie, S.-L. Huang, H.-L. Yang, and T.-Y. Chen.** 2008. Grouper Mx confers resistance to nodavirus and interacts with coat protein. *Dev. Comp. Immunol.* **32**:825-836
- 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 Immunol.* **23**:670-682
- Estepa A., Frías D., Coll JM.** 1992. Neutralising epitope(s) of the glycoprotein of viral haemorrhagic septicemia virus are expressed in the membrane of infected trout macrophages. *Bulletin European Associated Fish Pathology* **12**: 150-153
- Fernandez-Trujillo, M. A., E. García-Rosado, M. C. Alonso, and D. Castro.** 2013. Mx1, Mx2 and Mx3 proteins from the gilthead seabream (*Sparus aurata*) show in vitro antiviral activity against RNA and DNA viruses. *Mol. Immunol.* **56**:630-636
- Garcia, I., A. Galiana, A. Falco, A. Estepa, and L. Perez.** 2011. Characterization of an infectious pancreatic necrosis (IPN) virus carrier cell culture with resistance to superinfection with heterologous viruses. *Vet. Microbiol.* **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. Immunol. Immunopathol.* **121**:123-129
- Goodwin, A. E., G. E. Merry, and A. D. Noyes.** 2012. Persistence of viral RNA in fish infected with VHSV-IVb at 15°C and then moved to warmer temperatures after the onset of disease. *J. Fish Diseases* **35**:523-528
- 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* L. *J. Fish Diseases* **doi: 10.1111/jfd.12317**:
- 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. *Vet. Microbiol.* **166**:412-418
- Kileng, O., M. I. Brundtland, and B. Robertsen.** 2007. Infectious salmon anemia virus is a powerful inducer of key genes of the type I interferon system of Atlantic salmon, but is not inhibited by interferon. *Fish Shellfish Immunol.* **378-389**



- Larsen, R., P. Rokenes, and B. Robertsen.** 2004. Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by Atlantic salmon Mx1 protein. *J. Virol.* **78**:7938-7944
- Lorenzen, E., Carstensen, B., Olesen, N.J.,** 1999. Inter-laboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VHSV, IHN, and IPNV. *Dis. Aquat. Organ* **37**:81-87
- Martin-Armas, M., A.-I. Sommer, and B. Smedsrod.** 2007. Studies on uptake and intracellular processing of infectious pancreatic necrosis virus by Atlantic cod scavenger endothelial cells. *J. Fish Diseases* **30**:701-710
- Munro, E. S., S. Gahlawat, F. Acosta, and A. E. Ellis.** 2006. In infectious pancreatic necrosis virus carrier Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts, almost all kidney macrophages ex vivo contain a low level of non-replicating virus. *J. Fish Diseases* **29**:43-48
- N. Byrne, J. Castric, F. Lamour, J. Cabon, and C. Quentel.** 2008. Study of the viral interference between infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and infectious haematopoietic necrosis virus (IHN) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* **24**: 489-497
- Otto Haller, Peter Staeheli, Georg Kochs.** 2007. Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie.* **89**: 812-818
- Perez-Prieto, S. I., S. Rodriguez Saint-Jean, E. Garcia-Rosado, D. Castro, M. C. Alvarez, and J. J. Borrego.** 1999. Virus susceptibility of the fish cell line SAF-1 derived from gilt-head seabream. *Dis. Aquat. Org.* **35**:149-153
- Polinski, M. P., T. R. Fehring, K. A. Johnson, K. R. Snekvik, S. E. LaPatra, B. R. LaFrentz, S. Ireland, and K. D. Cain.** 2010. Characterization of susceptibility and carrier status of burbot, *Lota lota* (L.), to IHN, IPNV, *Flavobacterium psychrophilum*, *Aeromonas salmonicida* and *Renibacterium salmoninarum*. *J. Fish Diseases* **33**:559-570
- Purcell, M. K., K. J. Laing, and J. R. Winton.** 2012. Immunity to fish rhabdoviruses. *Viruses* **4**:140-166
- 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. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **136**:81-91
- R. Parreño, L. Almagro, A. Estepa y L. Perez.** 2014. Superinfection exclusion in IPNV-carrier EPC and SAF-1 cell cultures. Congreso: 9th International Symposium of Viruses of Lower Vertebrates. Malaga
- Skjesol, A., I. Skjveland, M. Elnes, G. Timmerhaus, B. N. Fredriksen, S. M. Jorgensen, A. Krasnov, and J. B. Jorgensen.** 2011. IPNV with high and low virulence: host immune responses and viral mutations during infection. *Virology J.* **8**:396
- Tafalla, C., V. Chico, L. Perez, J. M. Coll, and A. Estepa.** 2007. *In vitro* and *in vivo* differential expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx isoforms in response to viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) G gene, poli I:C and VHSV. *Fish Shellfish Immunol.* **23**:210-221
- Trottier, C., M. Colombo, K. K. Mann, W. H. Miller Jr, and B. J. Ward.** 2009. Retinoids inhibit measles virus through a type I IFN-dependent bystander effect. *FASEB J.* **23**:3203-3212
- Vo, N. T. K., A. W. Bender, D. A. Ammendiola, J. S. Lumsden, B. Dixon, and N. C. Bols.** 2015. Development of a walleye spleen stromal cell line sensitive to viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV IVb) and to protection by synthetic dsRNA. *Fish Shellfish Immunol.* **45**:89-93
- Winton, J. R., W. N. Batts, P. de Kinkelin, M. LeBerre, M. Bremont, and N. Fijan.** 2010. Current lineages of the *epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell line are contaminated with fathead minnow, *Pimephales promelas*, cells. *J. Fish Diseases* **33**:701-704
- Yi-Bing Zhang, Jian-Fang Gui.** 2012. Molecular regulation of interferon antiviral response in fish. *Developmental and Comparative Immunology.* **38**: 193-202

**Zou, J., B. Gorgoglione, N. G. H. Taylor, T. Summathed, P.-T. Lee, A. Panigrahi, C. Genet, Y.-M. Chen, T.-Y. Chen, M. U. Hassan, S. M. Murghal, P. Boudinot, and C. J. Secombes.** 2014. Salmonids have an extraordinary complex type I IFN system: characterization of the IFN locus in rainbow trout *Onchorhynchus mykiss* reveals two novel IFN subgroups. *J. Immunol.* **193**:2273-2286

**Zou, J. and C. J. Secombes.** 2011. Teleost fish interferons and their role in immunity. *Dev. Comp. Immunol.* **35**:1376-1387

