

# Resistencia a la infección por virus de salmónidos: inducción y potenciación, in vitro e in vivo, de un estado antivírico celular

*S. Rodríguez Saint-Jean y S. I. Pérez Prieto*

Laboratorio de Virología. Departamento de Microbiología Molecular. Centro de Investigaciones Biológicas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Ramiro de Maeztu, 9. E-28040 Madrid, España.  
Correo electrónico: sylvia@cib.csic.es

*Recibido en octubre de 2005. Aceptado en noviembre de 2005.*

## RESUMEN

El propósito de este trabajo fue analizar comparativamente la protección inducida por el ácido polycitidílico (poly I:C), un potente inductor de interferón, y algunos virus de salmónidos frente a infecciones producidas por virus homólogos o heterólogos, tanto in vitro (en células BF-2) como in vivo (en trucha común *Salmo trutta* L., 1758). Los resultados demostraron que los sobrenadantes de macrófagos de trucha común, estimulados con poly I:C y rhabdovirus, inducen una actividad antivírica e interferente considerable, especialmente frente a rhabdovirus heterólogos. La efectividad antivírica de esta actividad *citokina-like* fue distinta según los virus ensayados. También se constató una reducción alta de la mortalidad acumulada en truchas estimuladas con poly I:C (tres días antes de la infección) y coinfectadas con una mezcla de IPNV-IHNV en la misma proporción. Se observó una correlación entre estimulación, actividad antivírica y expresión de Mx mRNA. Los resultados indican que el interferón desempeña un papel importante en la pérdida de infectividad del IHNV en las coinfecciones con IPNV.

**Palabras clave:** IPNV, IHNV, VHSV, coinfecciones víricas, interferón, Mx, inmunidad inespecífica, virus de peces.

## ABSTRACT

### *Resistance to salmonid fish viral infections: Induction and improvement of cellular antiviral states*

*The present study aimed to analyse comparatively the protection induced by polycytidylic acid (poly I:C), a potent interferon inductor, and several salmonid fish viruses against homologous or heterologous viruses in vitro (in BF-2 cells) and in vivo in the brown trout *Salmo trutta* L., 1758), in single or dual infections. The expression of MxmRNA protein was used as an interferon marker. The results showed strong interference activity against rhabdoviruses in the supernatants of macrophages stimulated with poly I:C and with heterologous rhabdoviruses. The antiviral effectiveness of the cytokine-like activities differed amongst the several viruses tested. Moreover, high reduction of cumulative mortality was shown in poly I:C stimulated (3 days before infection) and IPNV-IHNV coinfecting trout. A correlation between stimulation, antiviral activity and mRNA-Mx protein expression was also observed. The results indicate that interferon-mediated activity plays a significant role in the loss of IHNV virulence when it is coinfecting with IPNV.*

**Keywords:** IPNV, IHNV, VHSV, viral coinfections, interferon, Mx, nonspecific immunity, fish viruses.

## INTRODUCCIÓN

Para establecer infecciones in vivo en vertebrados, los virus deben replicarse enfrentándose a poderosos mecanismos de defensa, entre los que destacan los mediados por interferones. Los RNA de doble cadena (dsRNA) producidos durante la replicación viral, inducen interferón de tipo I ( $\alpha$  y  $\beta$ ) que, a su vez, determinan un patrón complejo de cambios fisiológicos que conducen al establecimiento de un estado antiviral en las células todavía no infectadas. Este estado antiviral constituye una primera y crucial línea de defensa frente a las infecciones por virus, y viene determinado por la expresión de proteínas que inhiben la multiplicación del patógeno, como las proteínas Mx. Se ha comprobado que en peces, al igual que en mamíferos, la inducción rápida y específica de Mx, su estabilidad y altas concentraciones en las células inducidas, hacen que esta proteína sea muy útil como marcador molecular de producción de interferón y para determinar si una infección es de etiología viral (Trobridge y Leong, 1995; Trobridge *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2000). Las proteínas Mx son inducidas también por el RNA de doble cadena ácido polyinosin-policytidílico (poly I:C), que es un potente inductor de interferón tipo I.

Recientemente, Larsen, Torunn y Robertsen (2004) demostraron con claridad la capacidad antiviral de la proteína Mx1 de salmón atlántico *Salmo salar* L., 1758 sobre el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), en un ensayo con una línea de células CHSE-214 establecidas para expresar esencialmente Mx, ampliando así a los RNA virus de doble cadena la relación de virus susceptibles a la inactivación por estas proteínas antivirales.

Este sistema de defensa inespecífica en peces teleósteos ha despertado interés por su posible aplicación, si pudiera potenciarse, para proporcionar una mayor protección frente a infecciones de virus en las poblaciones susceptibles de especies cultivadas. Dada la falta de recursos farmacológicos e inmunológicos frente a las infecciones por virus, resulta de interés el examen de esta posibilidad, en especial si se pudiese aplicar en la potenciación de vacunas DNA.

Los ensayos sobre inmunoestimulación y actividad antiviral se han centrado en diversas especies de salmónidos, en especial trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) y salmón atlántico, pues se emplean en cultivos de elevado interés económico y se ha utilizado poly I:C como principal inductor (Jensen y Robertsen, 2000; Jensen, Larsen y Robertsen, 2002; Lockhart *et al.*, 2004). Sin embargo, apenas hay estudios sobre la capacidad inmunoestimulante de los virus de peces teleósteos, ni de la actividad inhibitoria que provocan frente a otros virus o frente a sí, y, en concreto, no se han realizado estudios en trucha común *Salmo trutta* L., 1758.

En este trabajo se examina la capacidad de los tres virus más importantes que afectan a salmónidos cultivados –el IPNV, el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) y el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV)– para activar la producción de interferón e inducir un estado antiviral y de protección en infecciones sencillas y dobles. Para ello, se utiliza un modelo de evaluación in vitro de la actividad antiviral en células BF-2 y un modelo de coinfección previamente descritos por Rodríguez Saint-Jean y Pérez-Prieto (en prensa) y Alonso, Rodríguez Saint-Jean y Pérez-Prieto, 2003, respectivamente. Los experimentos in vivo se realizaron en trucha común, en poblaciones controladas durante años y que han estado libres de virus.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Células y Virus

Se utilizó la línea celular BF2 (*Lepomis macrochirus* Rafinesque, 1819) (ATCC-CCL 91), creciendo a 25 °C en medio L 15 (Gibco) suplementado con l glutamina y 10 % suero fetal bovino. Los macrófagos de riñón de trucha común se obtuvieron y cultivaron según los protocolos de Secombes (1990). Los virus utilizados proceden de la American Type Culture Collection (ATCC) o de nuestra colección y fueron el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV, ATCC VR1318), el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV, ATCC VR714), el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV D1) y la coinfección IPNV-IHNV, una mezcla de

ambos virus que mantiene la misma proporción de unidades infectivas.

### Actividad antivírica

La actividad antivírica e interferente de los sobrenadantes de macrófagos de trucha común se determinó según los protocolos de Renault, Thochoy y De Kinkelin (1991) y Jensen y Robertsen (2002). Este ensayo mide la protección de células frente a la lisis celular inducida por virus, y se calcula mediante el porcentaje de células supervivientes tras la infección. Brevemente, se utilizaron células BF-2 (aproximadamente  $10^5 \text{ ml}^{-1}$ ) cultivadas en placas de 96 pocillos que se incubaron con 100  $\mu\text{l}$  de muestras de sobrenadantes de macrófagos de trucha común (4 pocillos por muestra), cultivados durante 24, 48 o 72 h en condiciones de estimulación (con poly I:C o con virus; en este caso, los sobrenadantes se inactivaron previamente a su utilización, a pH:2 y 60 min a 50 °C, en el caso del IPNV, y a 50 °C durante 60 min, en el caso de rhabdovirus); tras 48 horas de tratamiento, el medio se retiró y se lavaron los cultivos en PBS, tras lo que se añadieron a cada pocillo 100  $\mu\text{l}$  de IPNV, IHNV, VHSV o una mezcla de IPNV-IHNV, diluidos en medio libre de suero, a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,001. Tras la adsorción, se incubaron a 15 °C en medio de mantenimiento. Células no infectadas y tratadas con diluciones de poly I:C y FuGENE, se mantuvieron como control de toxicidad, y varios pocillos con medio de mantenimiento como control celular. Cuando se observaron efectos citopáticos (CPE) en las células infectadas y no tratadas, se fijaron y tiñeron las monocapas en una solución 1 % (w/v) de cristal violeta en 20 % etanol durante 10 min. Tras lavado y secado al aire, la tinción se disolvió en 100  $\mu\text{l}$  de etanol al 50 % conteniendo 0,05 moles de citrato sódico y 0,05 moles de ácido cítrico en cada pocillo. La absorbancia se midió en un lector de microplacas (BIORAD) a 590 nm. Los resultados se presentan como porcentajes de células supervivientes, donde el 100 % representa la absorbancia de las células de control no infectadas y tratadas del mismo modo que las células infectadas.

También se determinó la actividad interferente de los sobrenadantes de macrófagos estimulados con poly I: C y con los distintos virus. Se trató de establecer si la presencia de un virus u otro altera el efecto inducido por poly I:C solo, y qué grado de inhibición del título infectivo del virus se obtiene en cada caso. Para ello, se programaron experimentos de estimulación de los macrófagos y recogida de sobrenadantes similares a los descritos y se trataron monocapas de células BF2, previamente a su infección. Tras la aparición de efectos citopáticos en los controles de virus sin estimular, se recogieron los cultivos y se titularon en placas de 96 pocillos de células BF2 para establecer los rendimientos de virus infectivo.

### Extracción de RNA, transcripción inversa (RT) y PCR

La expresión de Mx en macrófagos o en órgano se determinó por RT-PCR. El RNA total de células y de tejidos se obtuvo por extracción con Trizol (Invitrogen). La transcripción inversa se realizó según el protocolo proporcionado por la empresa suministradora (First strand synthesis kit for RT-PCR, Amersham). La amplificación de cDNA se realizó según el kit comercial Gene-Amp PCR (Perkin-Elmer), utilizando los cebadores específicos para Mx-3 (directo, 5'-CGCTC-AACCAACATTACGAA-3') y Mx-4 (inverso, 5'-TCGATGAGTGTGAGGTCTGG-3') y cebadores específicos para B-actin (directo: 3'-AATCGTGGGGCGCCCCAGGCACC-5') (inverso: 3'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC-5') se utilizaron también como un control interno de PCR, para amplificar fragmentos de 415 pb y 514 pb de la Mx-3 y  $\beta$ -actin, respectivamente. La DNA polimerasa empleada fue la de Biotools, España. Las reacciones se sometieron a ciclos de amplificación (30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 58 °C, 30 seg a 72 °C) en un termociclador (Perkin Elmer Cetus, modelo 480). Los fragmentos de DNA amplificados se analizaron en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y se secuenciaron para su validación.

### Peces

Las truchas, de unos 4 meses de edad y un peso medio de 3,5 g, se obtuvieron de la pisci-

factoría de Uña (Cuenca), de la Consejería de Agricultura y Medio Ambiente de Castilla-La Mancha, que tiene un historial sanitario libre de virus, y se mantuvieron en acuarios de 300 l con circuito cerrado y temperatura controlada, en una habitación con ciclos de luz día-noche. Los experimentos se realizaron en series de acuarios de 45 l, en un sistema de temperatura controlada a  $13 \pm 1$  °C, y grupos de 10-12 peces por acuario, hasta un total de 20 peces por muestra.

Para comprobar el grado de protección que la inmuoestimulación con poly I:C puede proporcionar a poblaciones de trucha común frente a una coinfección de IPNV con IHNV, grupos de 20 peces por muestra fueron estimulados durante tres días mediante inyección con poly I:C (50 µg/pez) antes de ser infectados con IPNV, IHNV y una mezcla de IPNV-IHNV. Como controles se mantuvieron acuarios de 10 peces inyectados con PBS o con Poly I:C y se registraron las mortalidades acumulativas obtenidas a lo largo de 45 días. Este experimento se repitió dos veces con similares resultados. Se determinaron los valores de  $\chi^2$  y los niveles de probabilidad para evaluar las diferencias significativas en los grupos sometidos a diferentes infecciones.

## RESULTADOS

### Actividad antivírica

En la tabla I se resumen los resultados de la capacidad antivírica de los sobrenadantes de macrófagos estimulados con los distintos virus y poly I:C como control, y utilizados como pretratamiento de monocapas de BF-2 durante 24 y 72 horas que, posteriormente, se infectaron con virus.

En las condiciones de nuestro experimento (baja multiplicidad de infección), el poly I:C es capaz de inducir, en el sobrenadante de macrófagos estimulados, factores de protección frente a la infección en células BF-2 con IPNV, IHNV, VHSV y frente a la mezcla IPNV-IHNV; la protección, en general, aumenta ligeramente en presencia de un compuesto de transfección como FuGENE, y también si se aumenta el tiempo de estimulación hasta las 72 horas.

El VHSV es el único virus que, utilizado como inmuoestimulante de macrófagos durante solo 24 horas, es capaz de inducir, en el sobrenadante de estos macrófagos, factores que protegen la monocapa de BF2 frente al virus IPNV, al mismo

Tabla I. Protección de monocapas de células BF-2 frente a infecciones de virus tras la incubación con sobrenadantes de macrófagos estimulados o transfectados con poly I:C y con virus durante 24 y 72 h. <sup>(1)</sup>: los sobrenadantes que contienen IPNV se inactivaron a pH:2 y a 50 °C durante 60 min y el resto a 50 °C durante 60 min antes del tratamiento de las células BF-2. <sup>(2)</sup>: los números indican X-veces más protección que la monocapa del control virus y se calculan según la expresión  $X = (\% \text{ de células supervivientes en las monocapas tratadas e infectadas}) / (\% \text{ de células supervivientes en las monocapas infectadas})$ . (Coinf.): coinfección.

Inmuoestimulantes <sup>(1)</sup>	Virus							
	IPNV		IHNV		VHSV		Coinf. IPNV-IHNV	
	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
Poly I:C	2,3 <sup>(2)</sup>	3,2	0	2,9	3,6	0	1,9	0
Poly I:C-Fugene	3,8	2	0	3	6,1	6,9	2,8	2,5
IHNV	0	2,1	0	2	8,5	5,7	0	0
IHNV-Fugene	0	0	0	0	8,2	2,2	0	0
IPNV	0	0	0	0	0	0	0	0
IPNV-Fugene	0	0	0	0	0	0	0	0
Coinfección IPNV-IHNV	0	0	0	0	2	0	0	0
Coinfección IPNV-IHNV-Fugene	0	0	0	0	6,1	1,7	0	1,6
VHSV	1,5	0	0	0	3	4	0	1,2
VHSV-Fugene	3,4	0	0	0	0	0	0	0

nivel, aproximadamente, que la protección inducida por poly I:C. Esta protección se duplica en presencia de FuGENE.

El sobrenadante de macrófagos estimulados con IPNV o IPNV-FuGENE no indujo protección de las monocapas de BF-2 tratadas e infectadas con los distintos virus mencionados.

El sobrenadante de macrófagos estimulados con IHNV durante 24 y 72 h indujo protección de las células BF2 pretratadas e infectadas con VHSV, llegando, casi, a triplicar el nivel de protección inducido por poly I:C, mientras que el sobrenadante de macrófagos estimulados con la coinfección IPNV-IHNV durante 24 h indujo protección únicamente frente al VHSV, y esta protección en las células BF-2 pretratadas fue mayor cuando se estimuló en presencia de FuGENE, aproximadamente el triple, y el doble de protección que la inducida por Poly I:C. La prolongación de la estimulación hasta las 72 h no mejoró la protección inducida.

### Actividad interferente

La actividad interferente del medio de macrófagos estimulados con poly I:C y con los virus IPNV, IHNV, VHSV, IPNV-IHNV y la cepa 3B de IHNV, se determinó en células BF2 mediante el cálculo del rendimiento de virus en células control sin pretratar y en células tratadas con los sobrenadantes antes de la infección, y se resume en la figura 1. Frente al virus IPNV, los virus ensayados no mejoraron la actividad del poly I:C, mientras que, frente al virus IHNV, los sobrenadantes de macrófagos estimulados con poly IC indujeron alta actividad interferente, de unos 6  $\log_{10}$ ; la presencia de virus no iguala o mejora esta capacidad inactivante. También se observó una disminución del rendimiento de virus en células tratadas con sobrenadantes de macrófagos estimulados con la coinfección IPNV-IHNV (pérdidas de 2  $\log_{10}$  del título infeccioso con respecto al control virus). Frente a sí mismo, el IHNV combinado con poly I:C indujo una actividad interferente de 3  $\log_{10}$ .

Frente al VHSV, los sobrenadantes de macrófagos estimulados con poly I:C indujeron actividad interferente, con una pérdida de 2  $\log_{10}$  del

título del virus, que solo fue implementada por la presencia de IHNV o IHNV 3B. Frente a la coinfección, la presencia de virus en combinación con poly I:C fue decisiva, ya que poly I:C sólo inhibió 1  $\log_{10}$ , mientras que todos los sobrenadantes de macrófagos estimulados con virus indujeron actividades interferentes de diverso rango, algunas muy significativas, como las inducidas por IPNV o IHNV con disminuciones de 5  $\log_{10}$  y 6  $\log_{10}$ , respectivamente, en el rendimiento del título de virus.

Frente a la cepa 3B del IHNV, todos los sobrenadantes de macrófagos estimulados tuvieron una ligera acción interferente, con pérdidas de 1  $\log_{10}$  en los rendimientos de virus obtenidos en BF-2.

### Mortalidad acumulada

La figura 2 resume los resultados de uno de los experimentos. En las poblaciones pretratadas, las mortalidades acumuladas de los peces infectados con IPNV o IHNV fueron ligeramente inferiores a las mortalidades de los respectivos controles sin tratar, el 5 % menos en el caso del IHNV y el 13 % menos en el caso del IPNV ( $P > 0,1$ ). En la coinfección control, la mortalidad fue mucho menor (50 %) y estadísticamente significativa ( $P \leq 0,005$ ) que en las infecciones simples (75-78 %), como es habitual y ya ha sido descrito (Alonso, Rodríguez Saint-Jean y Pérez-Prieto, 2003); pero, además, los peces pretratados con poly I:C mostraron una disminución añadida del 20 % de mortalidad con respecto al control.

### Expresión de Mx

Se realizó un ensayo preliminar de la cinética de expresión de Mx mRNA en truchas comunes estimuladas con poly I:C y con virus para comprobar si existe correlación entre pérdida de infectividad y expresión de Mx mRNA, y si los virus testados son capaces de inducir la expresión de esta proteína antivírica. Se eligió el riñón, por ser un órgano en el que esta proteína se detecta bien en otras especies y por ser, además, un órgano diana en la multiplicación de los virus ensayados, lo que será objetivo de estudios posteriores.

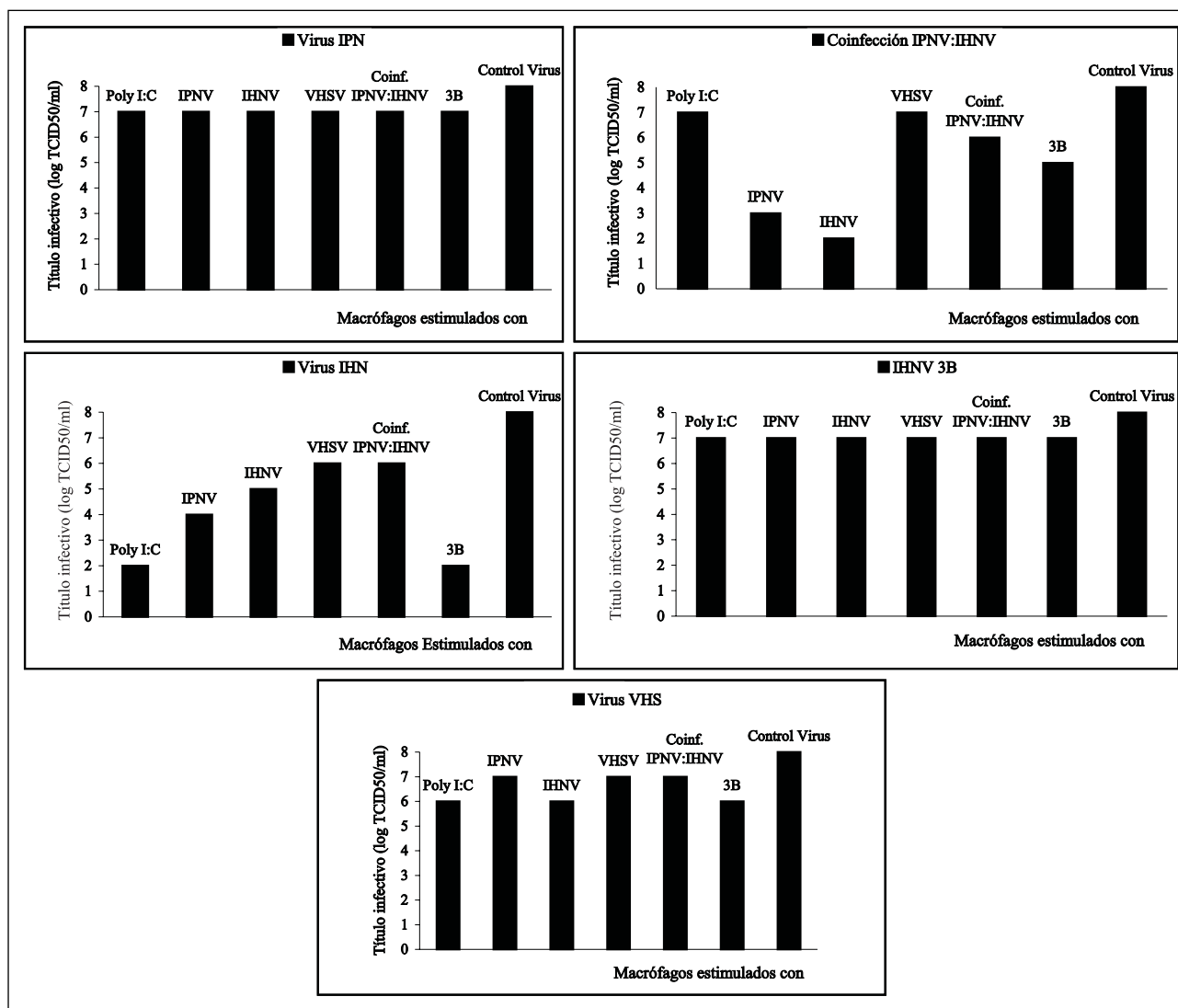


Figura 1. Título infeccioso de virus en células BF-2 tratadas durante 24 h con sobrenadantes de macrófagos de trucha común, estimulados durante 48 h con poly I:C, solo o en presencia de virus IPNV, IHNV, VHSV, coinfección IPNV-IHNV y la cepa IHNV3B. (Coinf.): coinfección.

Los resultados están resumidos en la figura 3 (tres peces por muestra) y demuestran que la expresión de Mx mRNA fue estimulada en todos los casos, y que los transcritos se detectaron a los 1, 2 y 3 días posestimulación, pero no a los 7 días (no se muestra este dato en la figura). Los peces control, inyectados con PBS, no mostraron Mx. Se utilizó  $\beta$ -actina como control de expresión constitutiva. Se comprueba que la inmunestimulación con virus y poly I:C induce interferón, y ello va ligado a una mayor protección frente a los virus testados.

## DISCUSIÓN

En mamíferos se ha demostrado, en numerosos estudios, que existe actividad antivírica mediada por varias proteínas inducidas por interferón, entre las cuales Mx es una de las más estudiadas (Goodbourn, Didcock y Randall, 2000). En peces teleosteos, este tipo de estudios también se ha desarrollado muy recientemente, demostrándose correlaciones entre la estimulación con poly I:C, la presencia de Mx y la inhibición de virus como el IPNV, pero el modo de

acción y las características de esta inhibición son aun desconocidas. Es importante determinar la capacidad de estimulación de los distintos virus, la capacidad de inhibición producida y su cinética para evaluar el potencial que la inmunidad innata puede ofrecer como recurso antiviral.

De acuerdo con la bibliografía consultada, en este trabajo se aborda por primera vez el ensayo comparativo de varios virus como estimulantes de la inmunidad inespecífica y la descripción de patrones de expresión de mRNA-Mx en trucha común. Hemos realizado un estudio preliminar sobre la habilidad de los virus de salmónidos más frecuentes para inducir estados antivirales celulares, que fueron evaluados *in vitro* e *in vivo* y relacionados con la presencia de Mx como marcador de interferón. Aunque estos temas son objetivo de interés reciente y se están desarrollando en distintos laboratorios (Nygaard *et al.*, 2000; Jensen y Robertsen, 2002; Robertsen *et al.*, 2003), la novedad de nuestro ensayo es que se realizó comparativamente con distintos tipos de virus y en la especie trucha común, muy poco estudiada en este sentido. Este modelo animal ofrece como aspecto interesante su mayor resis-

tencia a la infección por virus como el IPNV, que no se ha estudiado en profundidad. Para el presente trabajo se eligió utilizar una multiplicidad de infección (MOI) media, de 0,1, para la estimulación con virus (MOI = 0,1) y una baja, de 0,001, para la infección (MOI = 0,001), de manera que se favoreciese al máximo la manifestación de una actividad antivírica o interferente y su evaluación por métodos convencionales. En estas condiciones se demuestra que los virus ensayados presentan muy distinta capacidad inmunoestimulante en los macrófagos tratados *in vitro*, que además tiene una cinética diferente, y que, en general, los rhabdovirus indujeron en los sobrenadantes de estos macrófagos factores con capacidad antivírica, mayor a las 72 horas que a las 24 horas posestimulación. Las estimulaciones se realizaron en presencia o ausencia de FuGENE, un reactivo de transfección que favorece el tráfico de moléculas hacia el interior de la célula.

En un trabajo previo Rodríguez Saint-Jean y Pérez-Prieto (en prensa) se demostró que las células BF-2 son capaces de inducir interferón si se estimulan en presencia de transfectantes y

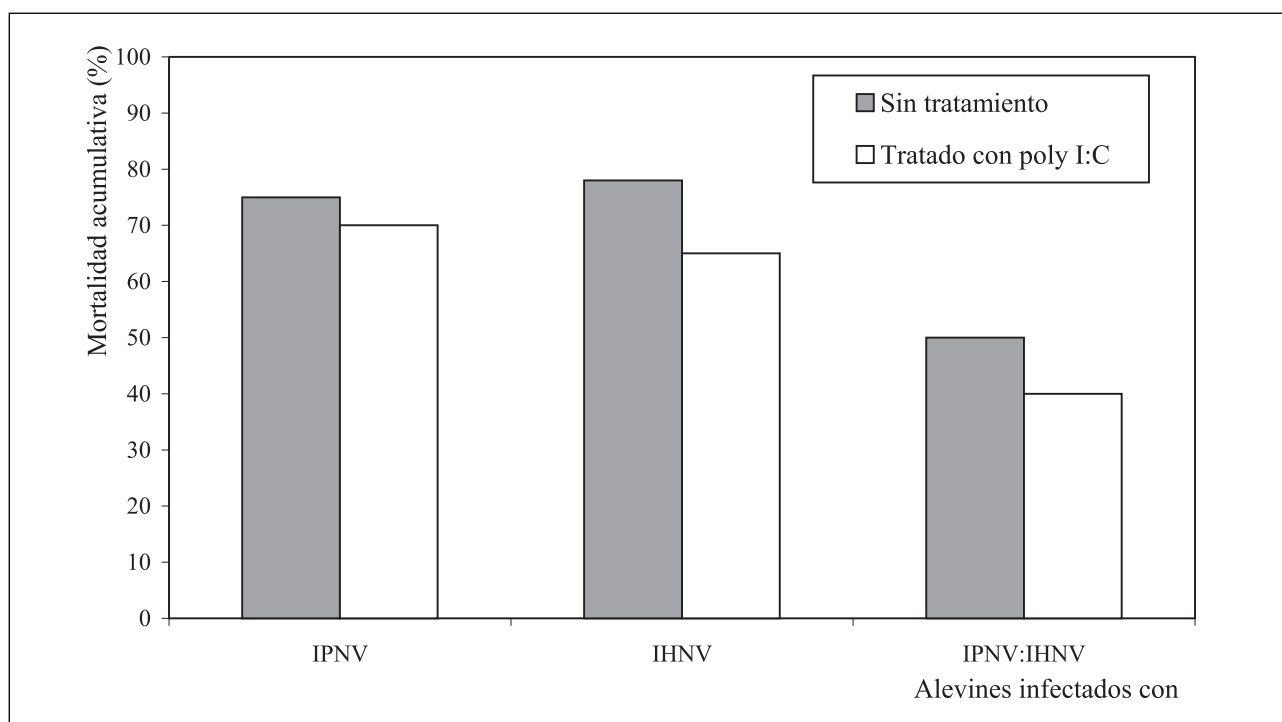


Figura 2. Mortalidad acumulada de alevines de trucha común tratados con poly I:C (50  $\mu\text{g}/\text{pez}$ ) durante tres días e infectados por inmersión con IPNV, IHNV o coinfectados con una mezcla de IPNV-IHNV en la misma proporción ( $10^6$  TCID<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup>).

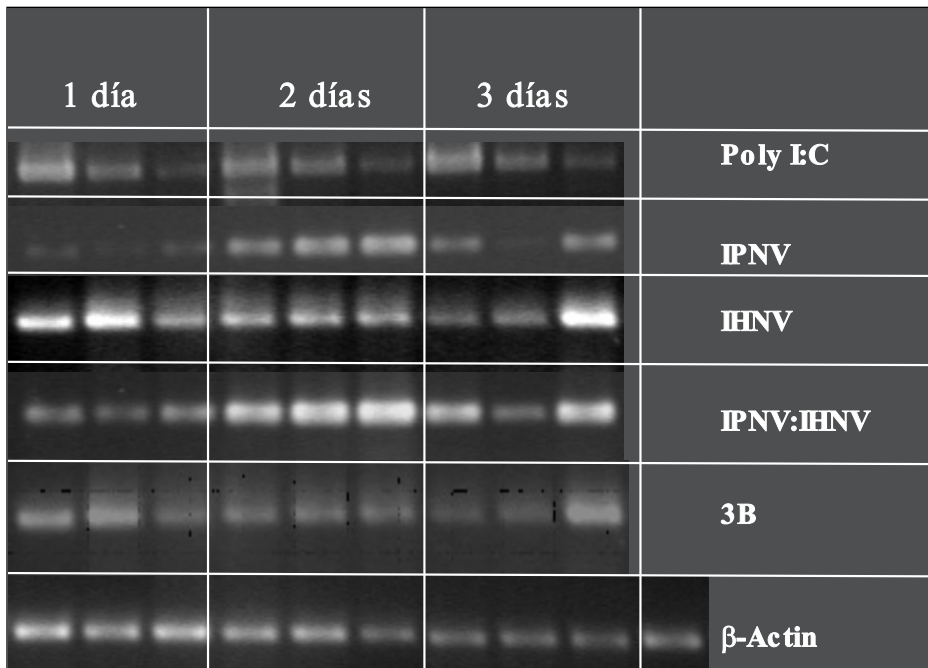


Figura 3. Inducción de mRNA<sub>x</sub> en riñón de peces en los tres días siguientes a su estimulación mediante inyección con poly I:C o con virus. Se procesaron tres peces por grupo. A los siete días no se detectaron transcritos ni en los estimulados ni en los peces control (datos no mostrados).

que son un buen modelo de estudio para las coinfecciones IPNV-IHNV y la inducción de actividad antivírica. Estas células parecen tener un receptor para interferón, pues también se activan a un estado antiviral con sobrenadantes de células previamente estimuladas. Otros autores (Jensen, Larsen y Robertsen, 2002) han descrito también esta capacidad para células CHSE-214 en presencia de transfectantes (estas células se creían inhábiles para la producción de interferón). En el presente trabajo, el modelo BF2 es adecuado para la replicación de los dos virus de la coinfección y en esas células se valoraron las actividades de todos los virus.

La presencia de FuGENE favoreció la protección inducida por algunos virus, como los de la coinfección IPNV-IHNV frente al VHSV, pero no alteró los resultados negativos, por ejemplo, en los sobrenadantes de macrófagos estimulados con IPNV.

En los experimentos de valoración del rendimiento del virus obtenido en células BF2 pretratadas con sobrenadantes de macrófagos, a su vez estimulados previamente con virus, se pretendía constatar si la presencia de un virus en combinación con poly I:C era capaz de potenciar el poder inmunoestimulante de éste. Se observaron, también, diferentes actividades según los virus utilizados, siendo IPNV el más resistente,

en el que la presencia de virus asociada a poly I:C no potenció inhibición, salvo en el caso de la cepa mutante IHNV3B, que parece comportarse de forma distinta al IHNV de referencia. Esta cepa presenta características interesantes, pues proviene de una coinfección natural con IPNV y presenta alteraciones, precisamente, en la secuencia del gen G (Alonso, Rodríguez Saint-Jean y Pérez-Prieto, 2003; Alonso, Rodríguez y Pérez-Prieto, 1999b) que podrían explicar estas diferencias.

Por el contrario, la estimulación de cualquiera de los virus combinados con poly I:C potenció la actividad interferente de los sobrenadantes frente a la coinfección IPNV-IHNV. El hecho de que las actividades detectadas en los virus en coinfección no coincidan con aquéllas observadas en los virus por separado, sugiere unas interacciones biológicas complejas en el transcurso de los ciclos conjuntos de multiplicación de estos virus, que, como se describió previamente, finalizan, tras varios pases sucesivos, en la pérdida de infectividad del IHNV (Alonso, Rodríguez y Pérez-Prieto, 1999a,b; Alonso, Rodríguez Saint-Jean y Pérez-Prieto, 2003). Esta pérdida de infectividad podría estar relacionada con la fuerte capacidad inmunoestimulante demostrada por el IHNV que, a su vez, es el virus más sensible a la

acción del interferón o a las proteínas antivíricas inducidas. El IPNV, en combinación con poly I:C, también inhibe significativamente el rendimiento de la coinfección, probablemente en la parte debida al IHNV.

La mayor sensibilidad de la coinfección ante la estimulación de un estado antiviral se corroboró en truchas infectadas. Los experimentos *in vivo* se centraron en los virus IPNV e IHNV en infección sencilla o en coinfección, y se compararon las infectividades en animales previamente estimulados, o no, con poly I:C; los resultados confirman la disminución de la mortalidad en todos los animales estimulados, pero muy especialmente en los estimulados y coinfectados. Paralelamente, se demostró una fuerte inducción de Mx en riñones de animales estimulados, tanto con poly I:C como con virus, durante al menos los tres primeros días postestimulación, corroborando resultados anteriores de correlación entre expresión de Mx y pérdida de infectividad. A los siete días postestimulación no se detectó Mx mRNA (dato no mostrado). Estos resultados muestran un patrón de expresión en trucha común similar al descrito en otras especies de salmonídeos. Jensen, Larsen y Robertsen (2002) fueron los primeros en realizar el primer estudio *in vivo* de expresión de Mx inducida por poly I:C en salmón atlántico, que mostró también menor mortalidad acumulada ante el virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV), e indicaban que el efecto antiviral era relativamente largo. Esto también fue descrito anteriormente por Eaton (1990) en otras especies de salmonídeos y en la carpa *Cyprinus carpio* L., 1758, que resultaron protegidas tras la inyección con poly I:C frente a IHNV. Es evidente que la situación *in vivo* es más compleja de estudiar que en una línea celular (pues involucra diferentes tipos de mecanismos antivíricos), pero todo señala a que juega un importante papel. Su mecanismo de acción es desconocido, pero recientes trabajos (Lin *et al.*, 2005) apuntan la interesante perspectiva de que las propiedades antivíricas de Mx puedan estar influidas por su localización intracelular y por el tipo de patógeno. Ello podría explicar las diferencias entre virus observadas en el presente trabajo, en especial en virus coinfec-

tados, y para una mejor aproximación, se está realizando una valoración cuantitativa de la expresión de mRNA-Mx inducida por los distintos patógenos.

Especial interés despiertan los resultados obtenidos con el virus IHNV 3B. Esta cepa es un mutante que presenta alteraciones en el gen de la proteína G (Alonso, Rodríguez Saint-Jean y Pérez-Prieto, 2003) que pueden ser determinantes para analizar las diferencias de inactivación y estimulación de esta cepa con respecto al IHNV de referencia. Boudinot *et al.* (1999, 2001) describieron la importancia de la inducción de unas proteínas antivíricas, Vig 1 y Vig 2, en la inactivación de VHSV, y apuntaban la posibilidad de que la inducción de estas proteínas sea responsabilidad de la proteína G de rhabdovirus, combinada con la inducción a través de la ruta del interferón.

Las conclusiones del presente trabajo se pueden resumir en las siguientes.

- Todos los virus ensayados indujeron actividad antivírica mediada por interferón tipo I, pero con grados de actividad distintos frente a los virus, siendo los rhabdovirus mejores inmunoestimulantes y también los más sensibles.
- La coinfección IPNV-IHNV proporciona un modelo útil para la evaluación de actividades antivíricas cruzadas.
- Los patrones de expresión de mRNA Mx en trucha común son similares a los descritos en otros salmonídeos.
- Se confirman los resultados anteriores sobre la inactivación *in vivo* de IHNV en coinfección con IPNV, que se potencia con poly I:C y se perfila el interferón como mediador de esta inactivación.

En definitiva, los resultados aquí presentados son preliminares, pero indican la necesidad de profundizar en el mayor conocimiento del potencial de estos virus como inductores de interferón y de la capacidad de éste como activador de estados antivíricos, así como de los mecanismos de evasión que los virus desarrollan. La posibilidad de obtención de nuevos recursos de protección ante infecciones de virus por esta vía merece ser contemplada.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la excelente ayuda técnica de M. Sánchez y L. Guaita, así como la colaboración de E. Montero, del Servicio del Medio Natural de la Delegación Provincial de Medio Ambiente de Cuenca, para la obtención de animales de experimentación. Este trabajo se realizó con la subvención de los proyectos AGL2001-1256 (Ministerio de Ciencia y Tecnología) y 2004-1931 (Ministerio de Educación y Ciencia).

## BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, M., S. Rodríguez y S. I. Pérez-Prieto. 1999a. Nested PCR improves detection of infectious hematopoietic necrosis virus in cells coinfecting with infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol. Methods* 81: 1-9.
- Alonso, M., S. Rodríguez y S. I. Pérez-Prieto. 1999b. Viral coinfection in salmonids: infectious pancreatic necrosis virus interferes with infectious hematopoietic necrosis virus. *Arch. Virol.* 144: 657-673.
- Alonso, M., S. Rodríguez Saint-Jean y S. I. Pérez-Prieto. 2003. Virulence of Infectious hematopoietic necrosis virus and Infectious pancreatic necrosis virus coinfection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and nucleotide sequence analysis of the IHNV glycoprotein gene. *Arch. Virol.* 148: 1507-1521.
- Boudinot, P., P. Massin, M. Blanco, S. Riffault y A. Benmansour. 1999. Vig-1, a new fish gene induced by the Rhabdovirus Glycoprotein, has a virus-induced homology in humans and shares conserved motifs with the MoA family. *J. Virol.* 73 (3): 1846-1852.
- Boudinot, P., S. Salhi, M. Blanco y A. Benmasour. 2001. Viral haemorrhagic septicaemia virus induces vig-2, a new interferon-responsive gene in rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunology* 11: 383-397.
- Eaton, W. D. 1990. Anti-viral activity in four species of salmonids following exposure to poly inosinic: cytidylic acid. *Dis. Aquat. Org.* 9: 193-198.
- Goodbourn, S., L. Didcock y R. E. Randall. 2000. Interferons: cell signaling, immune modulation, antiviral response and countermeasures. *J. Gen. Virol.* 81: 2341-2364.
- Jensen, I., R. Larsen y B. Robertsen. 2002. An antiviral state induced in Chinook salmon embryo cells (CHSE-214) by transfection with the double-stranded RNA poly I:C. *Fish & Shellfish Immunology* 13: 367-378.
- Jensen, V. y B. Robertsen. 2000. Cloning of a Mx cDNA from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and characterization of Mx mRNA expression in response to double-stranded RNA or infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 20: 701-710.
- Jensen, I. y B. Robertsen. 2002. Effect of double-stranded RNA and interferon on the antiviral activity of Atlantic salmon cells against infectious salmon anaemia virus and infectious pancreatic necrosis virus. *Fish & Shellfish Immunology* 13: 221-241.
- Kim, C. H., M. C. Johnson, J. D. Drennan, B. E. Simon, E. Thomann y J. C. Leong. 2000. DNA vaccines encoding viral glycoproteins induce nonspecific immunity and Mx protein synthesis in fish. *J. Virol.* 74: 7048-7054.
- Larsen, R., P. R. Torunn y B. Robertsen. 2004. Inhibition of Infectious Pancreatic Necrosis Virus Replication by Atlantic Salmon Mx1 protein. *J. Virol.* 78: 7938-7944.
- Lin, O. E., T. Ohira, I. Hirono, T. Saito-Taki y T. Aoki. 2005. Immunoanalysis of antiviral Mx protein expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) cells. *Dev. Comp. Immunol.* 29: 443-445.
- Lockhart, K., S. K. Gahlawat, D. Soto-Mosquera, T. J. Bowden y A. E. Ellis. 2004. IPNV carrier Atlantic salmon growers do not express Mx mRNA and poly I:C-induced Mx response does not cure the carrier state. *Fish & Shellfish Immunology* 17: 347-352.
- Nygaard, R., S. Husgard, A. Sommer, J. A. Leong y B. Robertsen. 2000. Induction of Mx protein by interferon and double-stranded RNA in salmonid cells. *Fish & Shellfish Immunology* 10: 435-450.
- Renault, T., C. Thochoy y P. de Kinkelin. 1991. Spectrophotometric method for titration of trout interferon and its application to rainbow trout fry experimentally infected by viral hemorrhagic septicaemia virus. *Dis. Aquat. Org.* 10: 23-29.
- Robertsen, B., V. Bergan, T. Rokenes, R. Larsen y A. Alburquerque. 2003. Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression and biological activity. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 23: 601-612.
- Rodríguez Saint-Jean, S. y S. I. Pérez-Prieto. (En prensa.) Interferon mediated antiviral activity against salmonid fish viruses in BF-2 and other cell lines. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 110: 1-10.
- Secombes, C. J. 1990. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. En: *Techniques in Fish Immunology*. J. S. Anderson, B. S. Roberson y W. B. van Muiswinkel (eds.): 137-154. SOS Publications. Fair Haven. Nueva Jersey, EE UU.
- Trobridge, G. D. y J. Leong. 1995. Characterization of a rainbow trout Mx gene. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 15: 691-702.
- Trobridge, G. D., P. Pinwen, P. P. Chiou y J. Leong. 1997. Cloning of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx2 and Mx3 cDNAs and characterization of trout Mx protein expression in salmon cells. *J. Virol.* 71: 5304-5311.