



UNIVERSIDAD  
SAN SEBASTIAN

FACULTAD DE  
MEDICINA Y CIENCIA

**FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIA  
ESCUELA DE BIOQUÍMICA  
SEDE SANTIAGO**

**GENÉTICA REVERSA DEL VIRUS DE LA NECROSIS PANCREÁTICA  
INFECCIOSA**

Seminario para optar al Título de Bioquímico.

**Profesora tutora: Dra. Andrea Aurora Rivas Aravena  
Estudiante: Jenny Mucha**

**© (Jenny Mucha) Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra en cualquier forma, medio o procedimiento sin permiso por escrito del o los autores.**

**Santiago, Chile  
2024**

## DEDICATORIA

Me gustaría partir agradeciendo a mi familia, que ha creído en mí en todo momento. En especial a mi mamá, por siempre estar a mi lado en los momentos difíciles y por, a veces, preocuparse más que yo; a mi papá, por su constante apoyo y consejos; a mi hermano Gonzalo, por aguantarme todos los días y por escucharme siempre al desahogarme o hablar de mis cosas nerds; a la Alejandra, por ser un apoyo incondicional; y a mis hermanos Maxi y Marc, por siempre sacarme una sonrisa.

También quiero agradecer a mis amigos, por su compañía durante este camino especial, desde aquellos que me han acompañado desde el colegio hasta los que conocí en esta bella etapa, y en especial a Pakary, Felipe, Catalina, Tamara y Nicolás.

A mis compañeros de laboratorio, por su apoyo continuo y por ayudarme a ver las cosas desde otra perspectiva: Jorge, Mauricio, Brandon, Tamara, Natalia, Daniela y al Jose, que gracias a él decidí ingresar a este laboratorio.

A mi tutora, la Dra. Andrea Rivas, por su dedicación y guía constante en este proceso, por mostrarme cómo ser una mejor profesional, tener pasión por la ciencia y aprender a no estresarme de más.

Y, por último, a mí misma, por mi perseverancia y esfuerzo, que hicieron que estos cinco últimos años fueran algunos de los mejores, dándome esperanza para el siguiente paso.

Gracias a todos por ser parte de estos cinco años.

Jenny.

## Tabla de contenido

<b>Tabla Figuras y/o Tablas</b> .....	<b>5</b>
<b>Tabla Figuras suplementarias</b> .....	<b>6</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>7</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>8</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>9</b>
1.1 Introducción a la salmonicultura.....	9
1.2 Virus de la necrosis pancreática infecciosa.....	9
1.3 Genética reversa .....	13
1.4 Hipótesis:.....	19
1.5 Objetivo general: .....	19
1.6 Objetivo específico: .....	19
1. Evaluar la expresión de las proteínas virales mediante la transfección en células CHSE-214 con los vectores que codifican los segmentos A y B del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), flanqueados por ribozimas. ....	19
<b>2. Detectar el ARNm de la proteína viral Vp2 en sobrenadantes derivados de pasajes celulares sucesivos a partir del lisado de las células transfectadas.</b> .....	<b>19</b>
<b>2. Materiales y Métodos:</b> .....	<b>20</b>
2.1 Cultivo Celular.....	20
Las células CHSE-214 se cultivan en medio esencial mínimo (MEM) con sales balanceadas de Earl (MEM/EBSS, Hyclone, GE Healthcare, Chicago, IL, USA) suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino (FBS, Biological Industries, Beit HaEmek, Israel), 1x solución de penicilina/estreptomicina (100 U/ml de penicilina y 0.1 mg/ml de estreptomicina, Hyclone), 1x aminoácidos no esenciales (MEM Nonessential, Hyclone) y 10 mM de HEPES (Hyclone). Los cultivos se mantienen a 17 °C en ausencia de CO <sub>2</sub> .....	20
2.2 Infección del virus .....	20
2.3 Vectores.....	20
2.4 Obtención de vectores .....	21
2.4.1 Transformación Bacteriana.....	21
2.4.2 Purificación de ADN plasmidial.....	21
2.4.3 Digestión enzimática del ADN.....	22
2.5 Transfección de los Vectores. ....	22
2.6 Pasajes de virus obtenido desde las células transfectadas.....	22
2.7 Inmunofluorescencia.....	23
2.8 Extracción del ARN e identificación del producto PCR .....	23
2.8.1 Extracción ARN genómico (ARNg) .....	23
2.8.2 PCR con Transcripción Inversa. (RT-PCR).....	24

<b>3. Resultados.....</b>	<b>26</b>
3.1 Purificación del vector .....	26
3.1 Transfección eGFP.....	26
3.3 Detectar la expresión de las proteínas virales luego de la transfección de los vectores que codifican los segmentos A y B del virus de la necrosis pancreática infecciosa. ....	30
3.4. Pasajes sucesivos del lisado de las células transfectadas.....	36
<b>4. Discusión.....</b>	<b>39</b>
<b>5. Conclusión .....</b>	<b>45</b>
<b>6. Referencias.....</b>	<b>46</b>

### Tabla Figuras y/o Tablas

<b>Figura 1: Representación esquemática del ARN genómico del segmento A de IPNV. .</b>	<b>10</b>
<b>Figura 2: Representación esquemática del ARN genómico del segmento B de IPNV..</b>	<b>11</b>
<b>Figura 3: Representación esquemática del ciclo replicativo de IPNV.....</b>	<b>12</b>
<b>Figura 4: Estructura secundaria e intermedio de reacción de la ribozima cabeza de martillo. ....</b>	<b>15</b>
<b>Figura 5: Estructura secundaria de las ribozimas genómicas del HDV. ....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 6: Representación esquemática del proceso posterior a la transfección de los vectores.....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 7: Digestión enzimática de los vectores que codifican para segmento B y A de IPNV. ....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 8. Transfección de 500 ng del vector eGFP-HA con Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent a las 24 horas en las células CHSE-214.....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 9: Transfección de 500 ng del vector eGFP-HA con Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent a las 24 y 72 horas en las células CHSE-214.....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 10: Transfección de 1 µg del vector eGFP-HA con Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent a las 24 horas en las células CHSE-214.....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 11: Transfección de 2 µg del vector eGFP-HA con Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent a las 24 horas en las células CHSE-214. ....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 12:Inmunofluorescencia de células CHSE-214 infectadas con IPNV. ....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 13: Inmunofluorescencia de células CHSE-214 infectadas con IPNV. ....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 14:Inmunofluorescencia de células CHSE-214 transfectadas con los vectores SegB_pcDNA 3.1 (+) y Vp1 pcDNA 3.....</b>	<b>33</b>

<b>Figura 15:Inmunofluorescencia de células CHSE-214 transfectadas con los vectores SegA_pcDNA 3.1 (+) y Vp2 pcDNA 3.....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 16:Inmunofluorescencia de células CHSE-214 transfectadas con los vectores SegB_pcDNA 3.1 (+).....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 17:Inmunofluorescencia de células CHSE-214 transfectadas con vectores SegA_pcDNA 3.1 (+).....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 18: Detección de Vp2 por RT- PCR. .</b>	<b>38</b>

<b>Tabla 1. Secuencias primers utilizados en RT-PCR. ....</b>	<b>24</b>
<b>Tabla 2. Programa del RT-PCR. ....</b>	<b>24</b>

#### **Tabla Figuras suplementarias**

<b>Figura suplementaria 1 .....</b>	<b>49</b>
<b>Figura suplementaria 2. ....</b>	<b>49</b>
<b>Figura suplementaria 3. ....</b>	<b>50</b>
<b>Figura suplementaria 4. ....</b>	<b>50</b>
<b>Figura suplementaria 5 .....</b>	<b>51</b>

## Resumen

La acuicultura es una de las principales actividades económicas de Chile. En consecuencia, los patógenos de los organismos acuáticos pueden ocasionar grandes pérdidas económicas. Una de las patologías más graves en salmónidos es provocada por el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), que es conocido por causar la enfermedad de necrosis pancreática infecciosa (IPN). A pesar de la introducción de estrategias de vacunación, el número de brotes de IPN ha aumentado en los últimos años. Por este motivo, un conocimiento más acabado sobre la biología molecular del virus resulta sumamente importante para futuras tácticas de control de brotes de IPN. La genética inversa ha demostrado ser una herramienta provechosa para comprender los mecanismos de replicación viral y el diseño de estrategias para prevenir y tratar enfermedades virales. Esta consiste en clonar el genoma viral en vectores que puedan ser transfectados en células blanco. La utilidad de esta técnica es que, al tener clonado el genoma viral, pueden modificarse sus proteínas y genomas, con el fin de estudiar su participación en el ciclo viral. Sin embargo, para aplicar esta herramienta para IPNV, es necesario que las secuencias 5' y 3' no traducidas (UTR) no tengan ninguna modificación respecto al virus silvestre, ya que ambos extremos son requeridos para la síntesis de ARN viral. Por lo tanto, se utilizaron ribozimas para conservar la secuencia exacta de los extremos 5' y 3'. Mediante la transfección de los vectores que contienen el genoma viral, es posible reconstituir el virus en las células transfectadas. Luego de sucesivos pasajes de los sobrenadantes de las células infectadas a un nuevo cultivo celular, este virus se puede amplificar, lo que puede corroborarse mediante la detección de los ARNm virales. Por lo que mediante un sistema de genética reversa, se espera que la expresión de vectores que contienen los segmentos A y B del genoma del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), flanqueados por ribozimas, en células CHSE-214 permita detectar el ARNm de las proteínas virales en pasajes celulares sucesivos.

## **Abstract**

Aquaculture is one of the main economic activities in Chile. As a result, pathogens of aquatic organisms can cause significant economic losses. One of the most severe diseases in salmonids is caused by the Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV), which is known to cause Infectious Pancreatic Necrosis (IPN). Despite the introduction of vaccination strategies, the number of IPN outbreaks has increased in recent years. For this reason, a more thorough understanding of the virus's molecular biology is crucial for future strategies to control IPN outbreaks. Reverse genetics has proven to be a valuable tool for understanding viral replication mechanisms and designing strategies to prevent and treat viral diseases. This involves cloning the viral genome into vectors that can be transfected into target cells. The advantage of this technique is that, by having the viral genome cloned, its proteins and genome can be modified to study their role in the viral cycle. However, to apply this tool for IPNV, it is necessary that the 5' and 3' untranslated regions (UTRs) remain unchanged compared to the wild-type virus, as both ends are required for viral RNA synthesis. Therefore, ribozymes were used to preserve the exact sequence of the 5' and 3' ends. By transfecting vectors containing the viral genome, the virus can be reconstituted in the transfected cells. After successive passages of the supernatants from infected cells to a new cell culture, the virus can be amplified, which can be confirmed by detecting viral mRNA. Therefore, using a reverse genetics system, the expression of vectors carrying segments A and B of the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) genome, flanked by ribozymes, in CHSE-214 cells is anticipated to enable the detection of viral protein mRNA across successive cell passages.

## **1. Introducción**

### **1.1 Introducción a la salmonicultura**

En Chile, los salmónidos representan la exportación no minera más importante del país, equivalente al 16,2% del total de estas (1). La existencia de patologías en los organismos acuáticos cultivados es una amenaza latente, pudiendo generar significativas pérdidas económicas (1). Los patógenos infecciosos, especialmente virales, se han convertido en un desafío relevante para la acuicultura, debido a la complejidad que lleva su investigación y la capacidad de controlar los brotes, lo cual es crucial para asegurar el crecimiento sostenible de esta industria. En Chile, el primer brote del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN, por sus siglas en inglés) se confirmó el año 1984 en cultivos de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (2). Desde entonces, el virus se ha extendido rápidamente por los diferentes centros de cultivo del país, convirtiéndose en un gran problema sanitario a la industria del salmón en etapas de agua dulce y, posteriormente, en el traslado de los peces al mar en el proceso de esmoltificación. A pesar de que se introdujeron estrategias de vacunación y se llegó a contar con cultivos de un salmón del Atlántico como en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) genéticamente resistente, el número de brotes mortales de IPN se ha incrementado en los últimos años, no solamente en Chile, sino también en otros países y particularmente en la fase de cultivo de agua dulce (3–5), demostrando que es un patógeno resistente a las alternativas preventivas, por lo que su investigación permitirá un conocimiento más acabado de su ciclo replicativo y de sus posibles blancos terapéuticos .

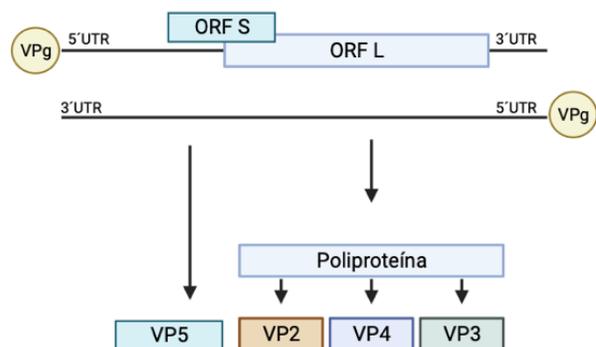
### **1.2 Virus de la necrosis pancreática infecciosa**

El virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV, por sus siglas en inglés *Infectious Pancreatic Necrosis Virus*) es un virus que afecta especialmente a los salmones y truchas (6). Pertenece al género Aquabirnavirus dentro de la familia *Birnaviridae* (7). Es un virus sin manto lipídico y posee una única cubierta que corresponde a una cápside icosaédrica de aproximadamente 60 nm (8,9). El IPNV es altamente contagioso y los peces

sobrevivientes se transforman en portadores asintomáticos que continúan esparciendo el virus al ambiente e infectando peces sanos (10). Este virus afecta a más de 63 especies diferentes de peces, moluscos y crustáceos, lo que lo convierte en el virus más extendido tanto en piscifactorías como en la naturaleza (1).

El genoma de IPNV está compuesto por dos segmentos de ARN de doble hebra, denominado ARN genómico (gARN). El gARN no presenta cap en su extremo 5' ni cola de poli(A) en el extremo 3'. Dobos y su grupo han demostrado que el extremo 5' de ambos segmentos presenta unida covalentemente la proteína estructural Vp1, la cual en esta forma se denomina Vpg, por *viral protein genome* (7,11).

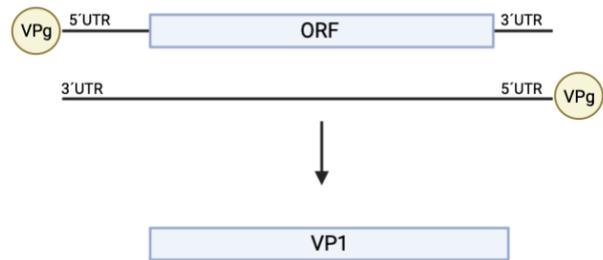
El segmento A (gARN-A) (Figura 1) tiene un tamaño aproximado de 3,1 kb y presenta dos marcos de lectura abiertos (ORF) sobrepuestos. El ORF mayor (ORF L), de 2916 nt de largo, codifica para una poliproteína (PP) de 106 kDa (NH<sub>2</sub>-pVp2-Vp4-Vp3-COOH) (7,9). La PP es modificada co-traduccionalmente mediante cortes proteolíticos mediados por la proteasa viral Vp4, que presenta actividad autoproteolítica (12), lo que genera las proteínas estructurales Vp2 y Vp3. La proteína Vp2 tiene un tamaño molecular de 54 kDa, es la única proteína que compone la cápside viral (8) y también es el principal blanco de los anticuerpos contra IPNV (13). La proteína Vp3, cuyo peso molecular es de 31 kDa, es una proteína de matriz viral (8). El segundo ORF del segmento A (ORF S) codifica para la proteína Vp5, a la cual se le ha atribuido una actividad antiapoptótica por su similitud con otras proteínas miembros de la familia Bcl-2 (14)



**Figura 1: Representación esquemática del ARN genómico del segmento A de IPNV. Creado con BioRender.com.**

El segmento B (gARN-B, Figura 2) tiene un tamaño aproximado de 2,9 kb y presenta solo un marco de lectura que codifica para la proteína Vp1. Esta proteína tiene un peso molecular de 94 kDa y está compuesta por 845 aminoácidos (12).

**Figura 2: Representación esquemática del ARN genómico del segmento B de IPNV. Creado con BioRender.com.**



El ciclo replicativo de IPNV, empieza con la unión de la proteína Vp2 a los receptores específicos de la superficie de las células hospedera [etapa 1, figura 3], el cual se sugiere que podría ser la Miosina-9 (15), seguida de su entrada mediante macropinositosis (16). Una vez en el interior, el genoma de ARN bicatenario, compuesto por los segmentos A y B, se libera al citoplasma [etapa 2, figura 3], donde comienza su replicación (17).

A continuación, ocurre la síntesis de ARNm monocatenario positivo (ssRNA+) [etapa 3, figura 3]. Este ARNm es traducido a las proteínas virales [etapa 4, figura 3], donde se sintetizan las proteínas Vp1, Vp2 y Vp3, Vp4 y Vp5, que son fundamentales para la replicación (18,19).

Posteriormente, Vp1 sintetiza el ARN genómico viral, que se asocia con la proteína Vp3, la cual interacciona con la proteína Vp2 [etapa 5, figura 3], ensamblándose los nuevos viriones [etapa 6, figura 3], que son liberados mediante lisis celular [etapa 7, figura 3], destruyendo la célula hospedera y permitiendo la propagación del virus (19).

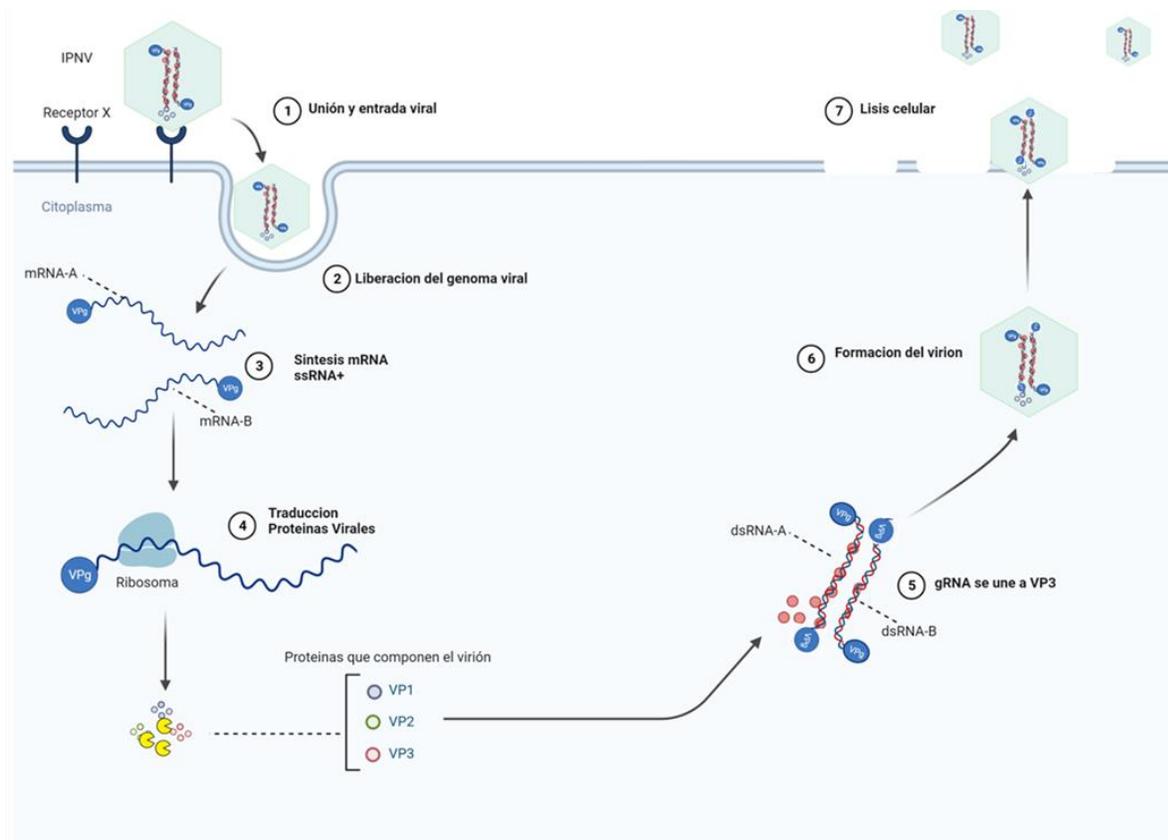


Figura 3: Representación esquemática del ciclo replicativo de IPNV. Creado con BioRender.com.

Una de las particularidades de este virus es la síntesis de su ARN viral. Para esto, el primer paso es la autoguanilación de Vp1, la cual sucede en una serina ubicada en la región N-terminal de Vp1, produciéndose la unión de dos GMP mediante un enlace fosfodiéster (11). Una vez se completa este proceso, Vp1 es capaz de interactuar con el ARN viral molde en el extremo 3' mediante el alineamiento por pares de bases de las dos guaninas de Vp1 con dos citosinas del extremo 3' del ARN viral. Esto le permite actuar como partidor de la síntesis de ARN. Según el modelo de síntesis de ARN viral propuesto por Dobos (20), una Vp1 libre extiende el 3'OH de la guanina, comenzando de esta forma la síntesis de la hebra complementaria del ARN viral. Debido a este modelo de replicación, **es requerido para la actividad de Vp1 que el ARN viral comience con dos guaninas y termine con dos citosinas**

Normalmente, un ARN mensajero (ARNm), que es un tipo de ARN de cadena única que participa en la síntesis proteica, presenta cap y cola de poli(A) para permitir su expresión. Sin embargo, el ARN de IPNV no posee ninguna de las dos estructuras. En el laboratorio se demostró que el ARNm del segmento A (ARNm sA) presenta un IRES en la región 5' UTR, que permite la traducción de la poliproteína. Adicionalmente, se demostró que la traducción del ARNm sA es dependiente de la temperatura, ya que los estudios evidencian que el 5' UTR del ARNm sA pierde parcialmente su conformación a una temperatura mayores de 33°C, lo que provoca que el IRES pierda su actividad y la traducción dependiente de IRES del ARNm sA sea inhibida. Sin embargo, si a este ARN se le agrega un cap, puede traducir de manera cap-dependiente a mayores temperaturas(21). Por otro lado, el ARN del segmento B no posee un IRES, y cuando se le agrega un cap y poli(A) puede expresar proteínas en células CHSE-214 (22)

Por otro lado, como carece de una cola de poli(A) en su extremo 3', se sugiere que la región 3'UTR debería poseer las propiedades necesarias para simular un ARNm celular que sea reconocido de manera competitiva por la maquinaria traduccional celular y defenderse de la actividad exonucleasa. Si se llegara a modificar su extremo 3', una de estas propiedades podría verse alterada. Sumado a esto, se ha demostrado en otro miembro de la familia *Birnaviridae*, el virus de la bursitis infecciosa (IBDV), que en el extremo 3' se forma una estructura secundaria de bucle. Al verse afectada por modificaciones en su secuencia y, por lo tanto, en su estructura, el bucle puede generar que se disminuya la efectividad en el inicio de la replicación (23)

**Por lo tanto, modificar el extremo 5' podría interferir con el IRES, que permite la traducción de la poliproteína, y modificar el 3' podría afectar funciones esenciales que el virus requiere para su replicación.**

### **1.3 Genética reversa**

A pesar de la importancia económica que reviste IPNV, es escasa la investigación que se ha realizado sobre su ciclo replicativo. Un conocimiento más profundo de la biología

molecular del virus es de suma importancia para futuras estrategias de control de brotes de IPN.

El sistema de genética reversa consiste en el clonamiento del genoma viral en vectores, los cuales pueden ser transfectados *in vitro*, para reconstruir al virus. Esta es una de las herramientas más poderosas en la virología molecular, mediante la cual se genera un virus recombinante infeccioso que puede ser manipulado genéticamente a partir del vector codificante para su genoma viral. Con esta estrategia, se puede investigar la función de genes virales específicos, manipular sus genes, comprender los complejos mecanismos de replicación viral y desarrollar estrategias eficaces para prevenir y tratar enfermedades de origen viral, por lo que sería muy útil para el estudio del ciclo replicativo de IPNV.

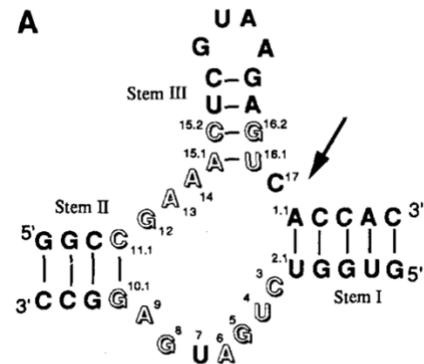
En 1998, el equipo de Kun Yao (24) generó un sistema de genética reversa para IPNV, basado en el uso de transcritos de ARN de hebra positiva derivados de clones de ADNc. Para poder mantener las dos citosinas en el extremo 3', requeridas por el modelo de replicación, incorporaron un sitio de restricción para SmaI (CCCC/GGGG), modificando el extremo 3' original (24). Esta modificación podría alterar el ciclo replicativo natural del virus, dado que, durante la replicación, la hebra negativa se sintetiza a partir de la hebra positiva, por lo que se necesita mantener ambos extremos íntegros para obtener una secuencia fiel al molde. Sumado a esto, para mantener las dos guaninas en el extremo 5', agregaron el promotor de la RNA polimerasa T7, la cual agrega una guanina al inicio de la transcripción.

En el laboratorio se diseñó un sistema de genética reversa utilizando la ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV, ver más abajo) en el extremo 3' y un promotor T7 en el extremo 5' de ambos segmentos para asegurar la presencia de las GG y CC requeridas por el sistema de replicación. Este sistema requiere que los segmentos se transfecten como ARN, lo que implica la obtención de ARN en grandes cantidades para su transfección, el cual es difícil de obtener en grandes rendimientos y conlleva altos costos. Además, las células CHSE-214, utilizadas en el trabajo, no son fácilmente transfectables debido a la temperatura a la que se mantienen las células, que es a 18 °C y debido a su composición lipídica, que puede no ser compatible con la del liposoma. Se ha visto que

los complejos liposoma-ADN han mostrado diferentes comportamientos de adsorción dependiendo de la composición lipídica de los modelos de biomembrana(25), lo que disminuye la eficiencia de transfección con los liposomas utilizados. Además, estos ARN deben ser transfectados con cap y cola de poli(A), como se observó en resultados preliminares, lo cual es muy distinto a los ARN virales de IPNV. Por estos motivos, utilizar transcritos de ADN resulta ser una estrategia más prometedora, por lo que, en este trabajo, se desea modificar el sistema de genética reversa, para que sea posible transfectarlo con ADN.

En 2007, el equipo de Xiaole Qi (26) generó un sistema de genética reversa para IBDV utilizando un promotor para la ARN polimerasa II. En este estudio, para mantener ambos extremos 5' y 3', se utilizaron las ribozimas Hammerhead y la ribozima HDV (26).

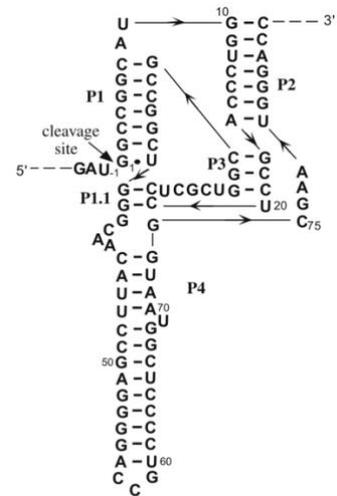
Las ribozimas son ARN catalíticos que tienen la capacidad de actuar como ribonucleasas, generando reacciones de escisión específicas en moléculas de ARN en secuencias sitio-específicas, pero no necesitan de una especificidad de secuencia. Las ribozimas más utilizadas son la ribozima Hammerhead y la ribozima del virus de la hepatitis delta (27). La ribozima Hammerhead es una ribozima pequeña con una estructura tridimensional característica similar a un “martillo”. Fue una de las primeras ribozimas descubiertas y estudiadas en detalle. La escisión se produce mediante un ataque nucleofílico del grupo hidroxilo 2' del residuo C17 sobre el grupo fosfato adyacente, rompiendo el enlace fosfodiéster y produciendo un fosfato cíclico 2',3' (28)



**Figura 4: Estructura secundaria e intermedio de reacción de la ribozima cabeza de martillo. (28)**

Por otro lado, la ribozima del virus de la hepatitis delta fue descubierta en el genoma del virus de la hepatitis delta. Se encuentra en los extremos de los ARN concatémicos, ya que, durante la replicación en círculo rodante del virus, varias copias del genoma son producidas en forma de concatémicos. Después de la transcripción, la HDV cataliza su

propia escisión y se genera la liberación del ARN circular del genoma viral para que posteriormente se forme el ensamblaje viral. La ribozima del HDV cataliza la escisión de su cadena principal de ARN mediante un ataque nucleofílico en el que el grupo hidroxilo 2' de la citosina nucleofílica (C75) ataca al grupo fosfato adyacente, lo que conduce a la escisión del enlace fosfodiéster. Esta reacción produce dos fragmentos de ARN: uno con un fosfato 2',3'-cíclico y el otro con un grupo hidroxilo 5' libre (29). Interesantemente, se ha demostrado que la actividad de esta ribozima es dependiente de la ARN polimerasa II, debido a que la secuencia de esta ribozima es parte del genoma que es dependiente de esta polimerasa y no del antigenoma, que es independiente (30), por lo tanto, su actividad es más eficiente en clonamientos de ADN para que sea transcrito en el núcleo, utilizando un promotor específico para esta polimerasa.



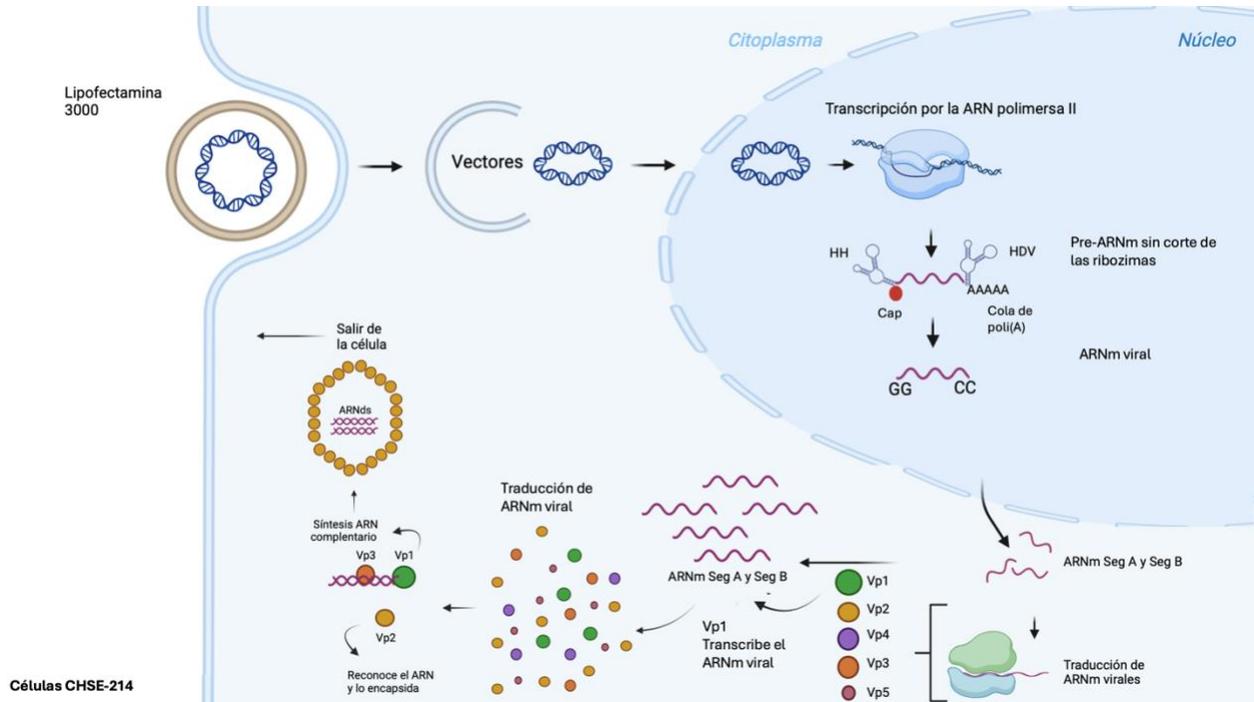
**Figura 5: Estructura secundaria de las ribozimas genómicas del HDV. La numeración de los nucleótidos en las ribozimas es de 5' a 3' desde el sitio de escisión, con el nucleótido 5' del sitio de escisión asignado. (29)**

La estrategia de transfectar ADN en lugar de ARN conlleva varias ventajas. El ADN es más estable que el ARN, ya que el ARN se degrada más fácilmente debido a su estructura química menos estable, la presencia de ribonucleasas y su estructura de hebra simple. Esto lleva a que el manejo del ADN sea más sencillo para distintas técnicas. Además, si se logra una transfección exitosa, esta puede ser más prolongada en el tiempo y generar de manera más eficiente el ARN viral. Por otro lado, la producción de ADN es de bajo costo y permite obtener grandes cantidades, lo que facilita la entrada del ADN en las células de manera eficiente y menos invasiva para la técnica de transfección.

Con el fin de generar una genética reversa que pueda ser transfectada como ADN, en esta propuesta se utilizarán ambas ribozimas para mantener la fidelidad de la secuencia de los extremos 5' y 3'. La ribozima Hammerhead se insertó en el extremo 5' para garantizar un 5' adecuado, debido a que se utilizará el promotor eucarionte del

citomegalovirus (CMV), uno de los promotores más estables y potentes utilizados para impulsar la expresión en diferentes líneas celulares eucariontes.

En la literatura se muestra (31) que este promotor requiere que los vectores sean diseñados de manera que el promotor se encuentre adyacente a la secuencia del gen de interés para iniciar la transcripción con el nucleótido deseado. En el laboratorio, el vector fue construido comercialmente, insertando los segmentos virales y las ribozimas a la secuencia original del vector pCDNA 3.1(+), que presenta el promotor CMV. Dado que el diseño se basó en la secuencia original, que tiene 10 nucleótidos de distancia entre el 3' del promotor CMV y el sitio de inicio de transcripción putativo, esto interferiría con las GG requeridas. La adición en el extremo 3' de la ribozima HDV, asegura mantener la secuencia exacta del 3'. Los vectores deben ser transfectados en la línea celular estándar para el estudio de IPNV, que es la línea celular chinook salmon embryo, CHSE-214. Una vez transfectados, los vectores deberán ingresar al núcleo, donde se llevará a cabo la transcripción por la ARN polimerasa II de los segmentos A y B con las ribozimas respectivas en cada extremo. Tras la transcripción de los segmentos, las ribozimas se estructurarán en su conformación secundaria y generarán los cortes específicos necesarios para que el ARNm viral comience con dos guaninas y termine con dos citosinas. De esta manera, posteriormente se traducirán estos ARNm para obtener las proteínas virales. La síntesis de Vp1 permitirá la replicación y la obtención del genoma viral. Posteriormente, el genoma deberá ser reconocido por Vp2, lo que debería llevar a su encapsidación y a la generación de partículas virales.



**Figura 6: Representación esquemática del proceso posterior a la transfección de los vectores. Creado con BioRender.com.**

Estas partículas se encontrarán en el sobrenadante del cultivo celular, que será utilizado para infectar, en sucesivos pasajes, nuevas células CHSE-214 para amplificar el virus. La verificación de la correcta transfección y del traspaso del virus en los pasajes subsiguientes se realizará mediante transcripción inversa seguida de PCR (RT-PCR) del ARNm de la proteína viral Vp2.

#### **1.4 Hipótesis:**

Mediante un sistema de genética reversa, la expresión de vectores que contienen los segmentos A y B del genoma del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), flanqueados por ribozimas, en células CHSE-214 permitirá la detección del ARNm de sus proteínas virales en pasajes celulares sucesivos.

#### **1.5 Objetivo general:**

Demostrar, mediante un sistema de genética reversa, que la expresión de vectores que contienen los segmentos A y B del genoma del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), flanqueados por ribozimas, en células CHSE-214 permite la detección del ARNm de las proteínas virales en pasajes celulares sucesivos.

#### **1.6 Objetivo específico:**

1. Evaluar la expresión de las proteínas virales mediante la transfección en células CHSE-214 con los vectores que codifican los segmentos A y B del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), flanqueados por ribozimas.
2. Detectar el ARNm de la proteína viral Vp2 en sobrenadantes derivados de pasajes celulares sucesivos a partir del lisado de las células transfectadas.

## **2. Materiales y Métodos:**

### **2.1 Cultivo Celular**

Las células CHSE-214 se cultivan en medio esencial mínimo (MEM) con sales balanceadas de Earl (MEM/EBSS, Hyclone, GE Healthcare, Chicago, IL, USA) suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino (FBS, Biological Industries, Beit HaEmek, Israel), 1x solución de penicilina/estreptomicina (100 U/ml de penicilina y 0.1 mg/ml de estreptomicina, Hyclone), 1x aminoácidos no esenciales (MEM Nonessential, Hyclone) y 10 mM de HEPES (Hyclone). Los cultivos se mantienen a 17 °C en ausencia de CO<sub>2</sub>

### **2.2 Infección del virus**

IPNV se propaga en células CHSE-214 cultivadas en medio de infección (MEM 2% v/v SFB, 100 U/ml de penicilina y 0.1 mg/ml de estreptomicina , 1x aminoácido no esenciales, 10mM HEPES, /EBSS, Hyclone) a 18 °C en ausencia de CO<sub>2</sub> por 48 h o hasta observar evidente efecto citopático (ECP). Para ello, células CHSE-214 se cultivan en placas de 24 pocillos, hasta alcanzar un 70%-80% de confluencia. Luego, la monocapa se lava dos veces con tampón fosfato salino (PBS). Posteriormente, las células se infectan con IPNV (cepa Hetch) a una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 0,1 ufp/célula a 18 °C. Luego de 1 hora de adsorción, se retira el inoculo, las células se lavan 2 veces con PBS y se agregan 500 µl de medio de infección fresco.

### **2.3 Vectores.**

Los vectores SegA\_pcDNA 3.1 (+) y SegB\_pcDNA 3.1 , que codifican los segmentos A y B; las regiones 5'UTR y 3'UTR del virus IPNV de la cepas Jasper ; y las secuencias de la ribozima Hammerhead al extremo 5' de cada segmento 5'-GGCTCTCTTTCCTGATGAGTCCGTGAGGACGAACTATAGGAAAGGAATTCCTATAGTC-3' y la secuencia de la ribozima de la hepatitis delta al extremo 3' de cada segmento 5'GGCCGGCATGGTCCCAGCCTCCTCGCTGGCGCCGGCTGGGCAACATTCCGAGG

GGACCGTCCCCTCGGTAATGGCGAATGGGACC-3' ( Qi et al., 2007) , son construidos por la empresa Genscript (GenScript Biotech Corporation, NJ, USA).

El vector comercial eGFP-HA (Addgene) se utiliza como control para las transfecciones, y los vectores Vp1\_pcDNA 3 y Vp2\_ pcDNA 3 se utilizan como control para las inmunofluorescencias. El mapa de estos vectores se presenta en las figuras suplementarias.

## **2.4 Obtención de vectores**

### **2.4.1 Transformación Bacteriana.**

Se agrega 100 ng de ADN plasmidial a 50 µl de *E. coli JM109* quimiocompetentes, y se incuban en hielo por 30 minutos. Posteriormente, se aplica un shock térmico a 42°C por 90 segundos y se incuba en hielo durante 10 minutos. Se agrega 1 ml de medio LB (10 g/L de triptona, 0,17 M de NaCl, 5 g/L de extracto de levadura) y se incuba a 37°C con agitación suave durante una hora. Se centrifuga por 5 minutos a 3000 x g, se elimina el sobrenadante, y el pellet de bacterias se resuspende en el volumen de medio LB restante. Finalmente, se siembran las bacterias en placas de LB agar/Ampicilina (10 g/L de triptona, 0,17 M de NaCl, 5g/L de extracto de levadura y 15 g/L de agar).

### **2.4.2 Purificación de ADN plasmidial.**

Se utiliza el sistema GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Para ello, se cultivan 5 ml de *E. coli* transformada con 1% del antibiótico de selección durante la noche. El ADN obtenido se eluye en 50 µl de buffer de Elution. Luego, se cuantifica la concentración de ADN (NanoDrop™ Lite Thermo Scientific™) y se verifica la integridad de este mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (Lafken) en buffer Tris-Borate-EDTA (TBE) Buffer pH 8.3, teñido con safeview 1X (NBS Biological). Para obtener mayores concentraciones, se utiliza el sistema GeneJET Plasmid Midiprep Kit (Thermo Scientific), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Para ello, se cultivan 100 ml de *E. coli* transformada con 1% del antibiótico de selección durante la noche. El ADN obtenido se eluye en 350 µl de buffer de Elution. Según las

indicaciones del kit, se realiza una segunda dilución de las columnas con 150 µl de buffer de Elution. Luego, se cuantifica la concentración de ADN (NanoDrop™ Lite Thermo Scientific™) y se verifica la integridad de este mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (Lafken) en buffer Tris-Borate-EDTA (TBE) Buffer pH 8.3, teñido con safeview 1X (NBS Biological).

#### **2.4.3 Digestión enzimática del ADN.**

Se digieren 200 µg de cada vector. Para el vector pcDNA3.1(+) sB, se utiliza la enzima *ApaI* (Thermo Fisher) y pcDNA3.1(+) sA, la enzima *SspI* (Thermo Fisher), de acuerdo con las condiciones indicadas por el proveedor, en un volumen final de 30 µl para comprobar la integridad de los vectores purificados. Ambas reacciones se inactivan a 80°C por 20 minutos.

#### **2.5 Transfección de los Vectores.**

Se utilizan células CHSE-214 con un 70 y un 90% de confluencia, cultivadas en placas de 24 pocillos con cubreobjetos. Se emplea el kit Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent (Thermo Fisher), de acuerdo con las condiciones indicadas por el proveedor, para realizar la transfección de los vectores. La transfección del vector eGFP-HA se observa en un microscopio de fluorescencia invertido (Olympus LS).

#### **2.6 Pasajes de virus obtenido desde las células transfectadas.**

Para obtener el virus, se utiliza una pipeta como rastrillo para despegar las células transfectadas de la monocapa. Posteriormente, todo el contenido se trasfiere a un tubo eppendorf. Estos se incuban a -80°C por 10 minutos y luego a temperatura ambiente por 20 minutos para lisar las células; este proceso se repite 3 veces. Luego, se centrifuga a 15.000 g por 15 minutos y se recoge el sobrenadante. Para los pasajes virales, las células se cultivan en placas de 24 pocillos hasta alcanzar un 70%-80% de confluencia, y luego la monocapa se lava dos veces con PBS. Posteriormente, las células se infectan con los sobrenadantes de las células transfectadas. La infección se realiza con 75 µl de sobrenadante o con una dilución 1/10 (7,5 µl del sobrenadante en 67,5 µl de medio MEM), según el protocolo de infección de IPNV y se mantuvieron durante 10 días o hasta un ECP.

## **2.7 Inmunofluorescencia**

Se remueve el sobrenadante de las células, las cuales se lavan dos veces con 500 µl de PBS y se fijan con 300 µl de metanol a -20°C por 5 minutos. Luego, se lavan dos veces con 500 µl de PBS. Posteriormente, las células se permeabilizan durante 10 minutos a temperatura ambiente con 100 µl de Tritón-X 100 al 0,3% y se lavan dos veces con PBS. Luego, se bloquean utilizando 100 µl de una solución al 1% de albúmina sérica bovina (BSA) en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavan con PBS y se incuban con 100 µl de una solución de DAPI diluido en PBS 1:1000 durante 5 minutos. A continuación, se incuban con 100 µl de una dilución de anticuerpo primario anti-Vp1 (Genscript) 1:500 por 1 hora a temperatura ambiente, o anti-IPNV o Vp2 (Angos) 1:125 (diluido en solución de bloqueo: PBS 1X + TWEEN 0,1% + BSA 1% + glicina 22,52 mg/mL) durante toda la noche a temperatura ambiente. Luego, se lavan las células dos veces con PBS y se incuban con 100 µl de anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor 488 (A11001 Invitrogen) y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a Alexa Fluor 594 (Invitrogen) respectivamente, utilizando una dilución 1:2000 e incubando las muestras por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se lavan tres veces con 500 µl de PBS, se montan con 4 µl del reactivo Fluoromount-G™ (Invitrogen) y se dejan incubando 30 minutos en oscuridad a 4°C. Luego, se sellan con esmalte de uñas en portaobjetos para ser observadas al microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot (Zeiss, Oberkochen, Alemania) con el software Axiovision. Las imágenes se analizan utilizando el programa ImageJ (Wayne Rasband, NIH)

## **2.8 Extracción del ARN e identificación del producto PCR**

### **2.8.1 Extracción ARN genómico (ARNg)**

Para obtener el ARN genómico de las células, se utiliza una pipeta como rastrillo para despegar las células de la monocapa. Posteriormente, todo el contenido se transfiere a un tubo Eppendorf. Estos se incuban a -80°C por 10 minutos y luego a temperatura ambiente por 20 minutos para lisar las células; este procedimiento se realiza tres veces. Luego, se centrifugan a 2.000 g por 5 minutos. Se toman 300 µl del sobrenadante y se tratan con 1 U de DNase RQI (Thermo) durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, se

agregan 300 µl de solución de extracción (Tris-HCl 0.2 M pH=8, SDS 1%, EDTA 10 mM) y 7,4 µl de proteinasa K (10 mg/mL). La mezcla se incuba durante 1 hora a 50°C. Luego, se añade un volumen de fenol básico, se vortexea durante 30 segundos y se centrifuga a 14.000 g por 1 minuto a 4°C. Se recoge la fase acuosa y se transfiere a un nuevo tubo Eppendorf. Se agrega un volumen de cloroformo, se vortexea por 30 segundos y se centrifuga a 14.000 g por 1 minuto a 4°C. La fase acuosa se transfiere a un nuevo Eppendorf. Se añaden 2.5 volúmenes de etanol 100% frío y 1/10 de acetato de sodio (3M), dejándose precipitar durante 30 minutos a -20°C. Luego, se centrifuga a 14.000 g por 30 minutos. Se elimina el sobrenadante por inversión y se añade 1 ml de etanol 70% frío. Se centrifuga a 14.000 g por 15 minutos a 4°C. Se elimina el sobrenadante por inversión, se evapora el etanol restante a 65°C durante 15 minutos y se resuspende el pellet con 30 µl de agua libre de nucleasas. La concentración se determina midiendo la absorbancia a 260/280 nm (Tecan).

### 2.8.2 PCR con Transcripción Inversa. (RT-PCR)

Para la identificación de la presencia del ARNm de la proteína viral Vp2, se utiliza el kit Takyon 1 -Step QRT-PCR converter (Eurogentec) de acuerdo con las condiciones indicadas por el fabricante.

**Tabla 1. Secuencias primers utilizados en RT-PCR.** En la tabla se muestran las secuencias utilizadas para la amplificación de Vp2 del segmento A .

Segment o	Experiment o	Primer ( <i>forward</i> )	Primer ( <i>reverse</i> )
A (Vp2)	RT-PCR	5'- CCGCAACTTACTTGAGATCCATTATG C-3'	5'- CGTCTGGTTCAGATTCCACCTGTAGT G-3'

**Tabla 2. Programa del RT-PCR.** En la tabla de muestran los programas a utilizar para cada PCR.

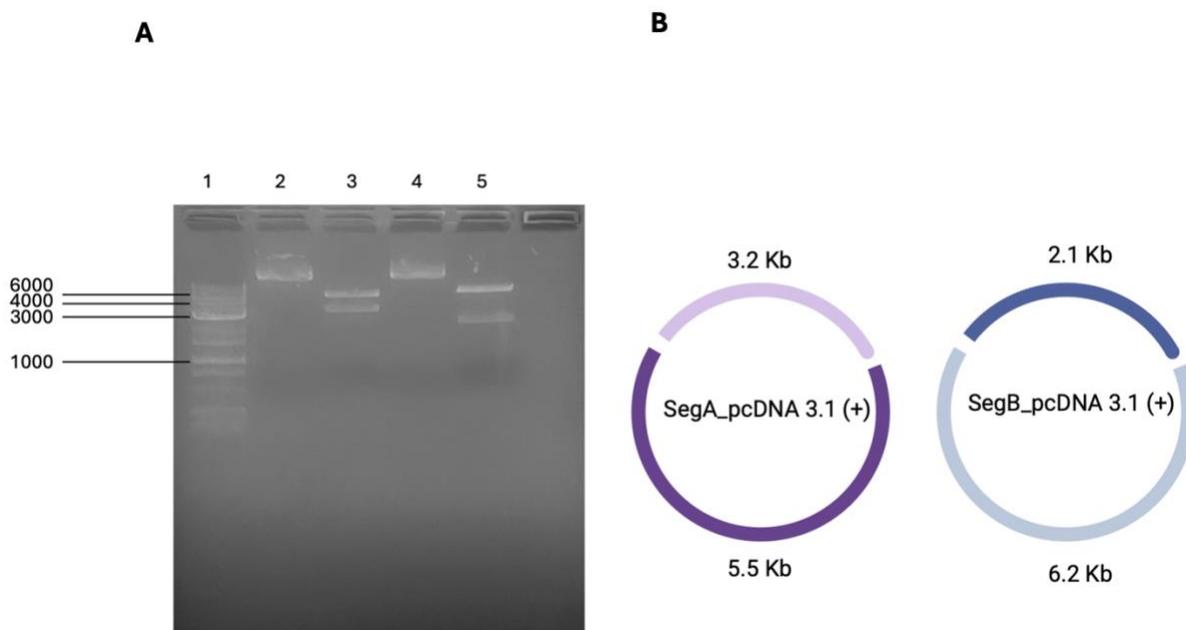
RT-PCR	Hold	PCR (40 X)	Melt Curve
--------	------	------------	------------

Vp2	Paso 1: 48 °C - 30 min Paso 2: 95°C – 30 seg	Paso 1: 95°C – 30 seg Paso 2: 50°C – 50 seg	Paso 1: 95°C – 30 seg Paso 2: 60°C – 50 seg Paso 3: 95°C – 30 seg
-----	---	--	---

### 3. Resultados

#### 3.1 Purificación del vector

Para verificar la integridad de los vectores SegA\_pcDNA 3.1 (+) y SegB\_pcDNA 3.1 (+), se realizó una digestión enzimática. El vector SegA\_pcDNA 3.1 (+), fue digerido con *SspI* y el vector SegB\_pcDNA 3.1 (+), fue digerido con *ApaI*, y fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% . En la Figura 6, se observa el corte correcto de los vectores, verificando su integridad.

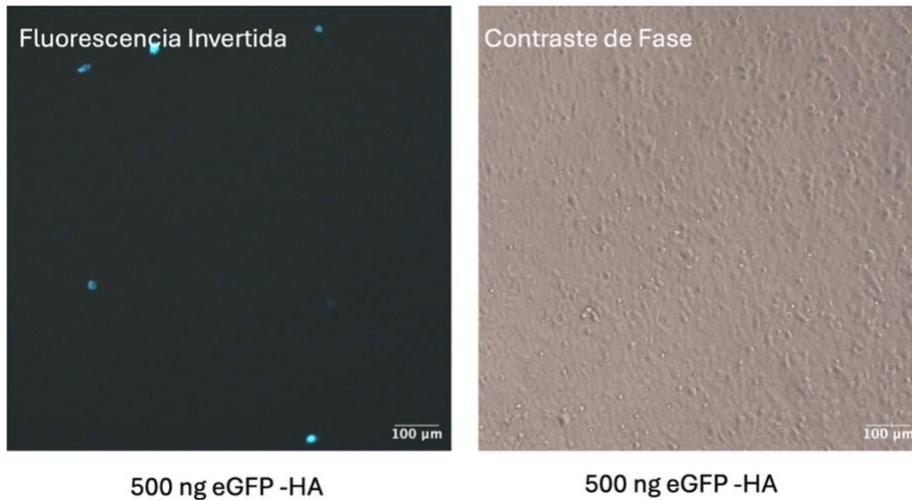


**Figura 7: Digestión enzimática de los vectores que codifican para segmento B y A de IPNV. (A) Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1: AccuRuler 1 Kb Plus DNA; Carril 2: SegA\_pcDNA 3.1 (+) no digerido; Carril 3: SegA\_pcDNA 3.1 (+) digerido con *SspI*; Carril 4: SegB\_pcDNA 3.1 (+) no digerido; Carril 5: SegB\_pcDNA 3.1 (+) digerido con *ApaI*. B. Esquema de los cortes con enzima de restricción en los ambos vectores.**

#### 3.1 Transfección eGFP

Para determinar las condiciones óptimas de transfección con Lipofectamine™ 3000, se utilizó el vector eGFP-HA. En un primer ensayo, se utilizaron las condiciones sugeridas por el proveedor, siendo 0.75  $\mu$ l, 1,1  $\mu$ l y 1,5  $\mu$ l del Lipofectamine™ 3000 Transfection

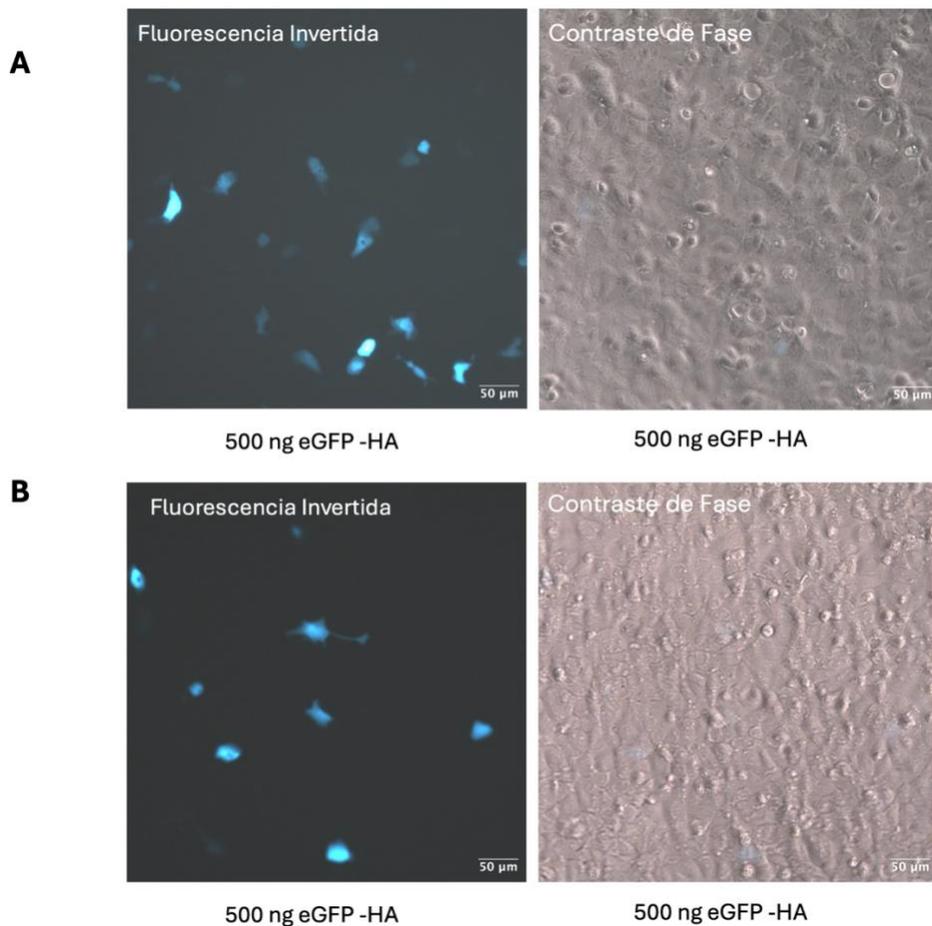
Reagent y 500 ng de ADN. Este experimento se realizó a 17 °C debido a que es la temperatura a la que se debe mantener la línea celular CHSE-214, sin embargo, no se logró ver una transfección eficiente a las 24, según lo observado en la figura 7.



**Figura 8. Transfección de 500 ng del vector eGFP-HA con Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent a las 24 horas en las células CHSE-214. Transfección se realizó a 17 °C. n=1.**

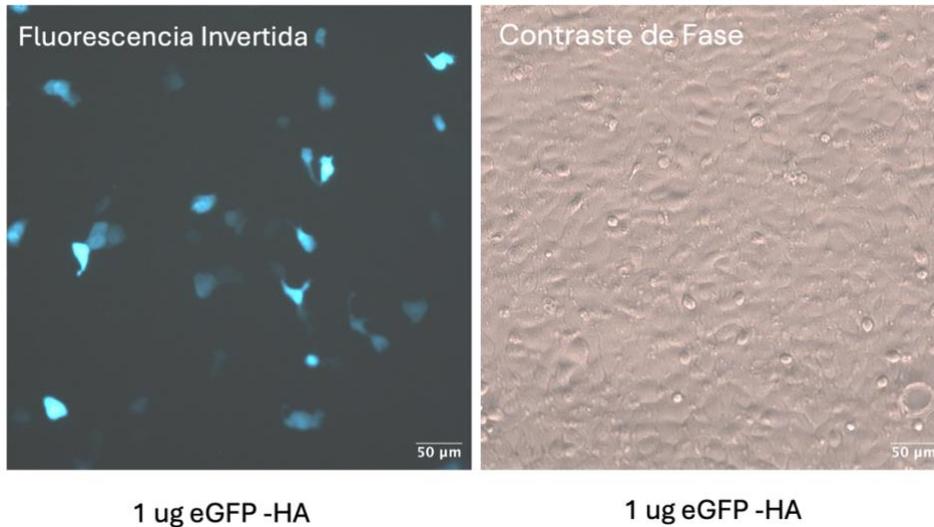
Las líneas celulares de peces presentan una baja eficiencia en la transfección (32). Sin embargo, en un estudio realizado en la misma línea celular, para optimizar un protocolo de transducción de Lentivirus para la integración eficiente de constructos en el genoma se observó que, al aumentar la temperatura, se mejora la eficiencia de transfección, por lo que se simuló las condiciones establecidas por los autores (28).

En la transfección, se utilizó 500 ng del vector eGFP-HA con 1,5 µl de Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent y se mantuvo a 22 °C durante las primeras 24 horas, y posteriormente se disminuyó gradualmente la temperatura hasta llegar a los 18 °C. Como se muestra en la figura 8, a las 24 horas de transfección se obtuvo un porcentaje de transfección de aproximadamente 9.4 % , el cual no aumentó luego de 72 horas.



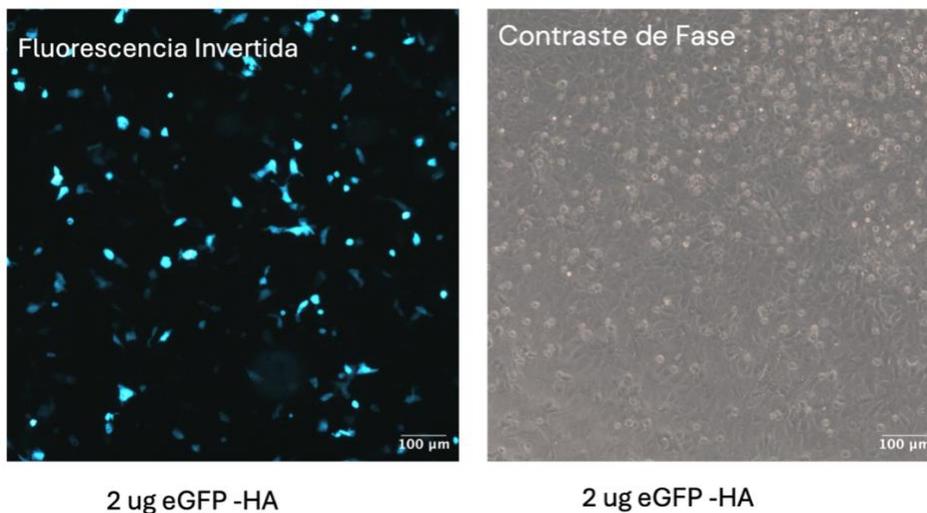
**Figura 9: Transfección de 500 ng del vector eGFP-HA con Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent a las 24 y 72 horas en las células CHSE-214. (A) Transfección de 500 ng del vector eGFP-HA a las 24 horas de transfección; (B) Transfección de 500 ng del vector eGFP-HA a las 72 horas de transfección. Transfección se realizó a 22 °C. n=1.**

Posteriormente, para aumentar el rendimiento, se realizó una transfección con el doble de la concentración, es decir, 1 µg del vector eGFP-HA, obteniéndose un 11,7 % de rendimiento de transfección, el cual no aumentó hasta las 72 horas, con respecto a las 24 horas.



**Figura 10: Transfección de 1 µg del vector eGFP-HA con Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent a las 24 horas en las células CHSE-214. Transfección se realizó a 22 °C. n=1.**

Aunque el porcentaje de transfección obtenido es suficiente para desarrollar este proyecto, realizamos otra transfección con el doble del vector eGFP, por lo tanto, serían 2 µg.



**Figura 11: Transfección de 2 µg del vector eGFP-HA con Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent a las 24 horas en las células CHSE-214. Transfección se realizó a 22 °C. n=1.**

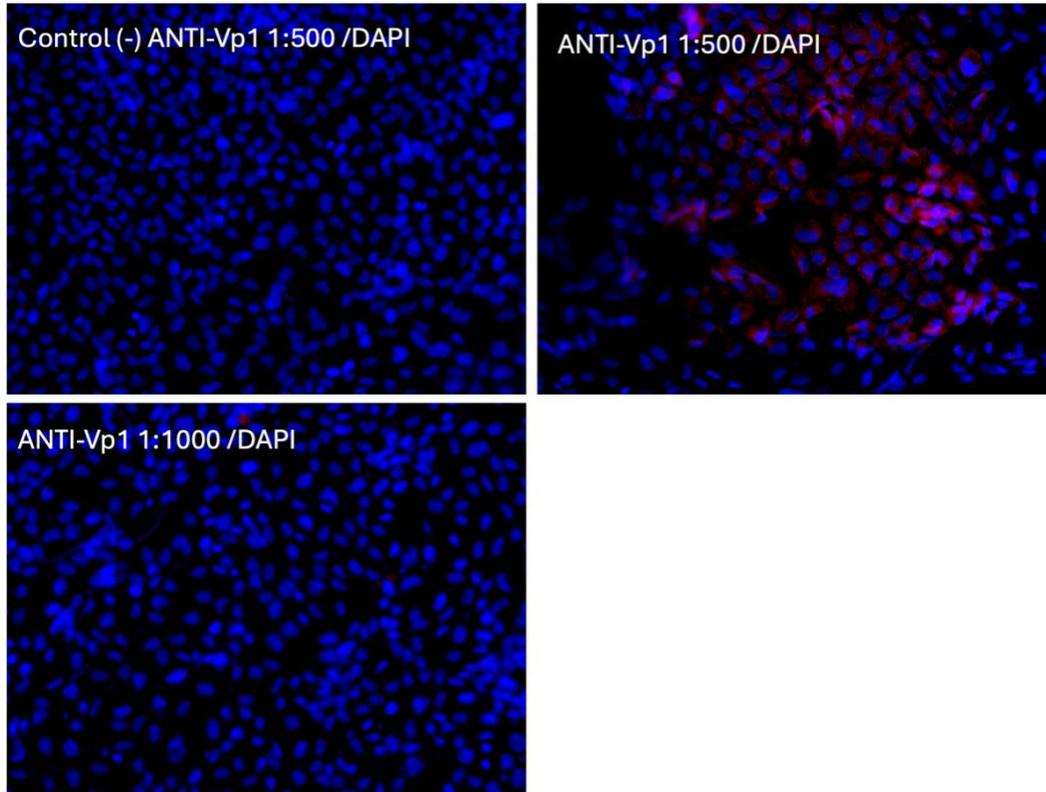
En esta transfección se obtuvo un porcentaje de 13,8 % de rendimiento de transfección el cual no aumentó hasta las 72 horas.

Para este proyecto se decidió utilizar las concentraciones 1 µg y 2 µg de vector, debido al rendimiento en la transfección y, ya que en distintas genéticas reversas (26,31,34) se han utilizado distintas concentraciones de ADN, por lo que se buscó un promedio entre las concentraciones utilizadas y se va a probar si estas dos concentraciones son adecuadas para este proyecto.

De esta forma, la recuperación del virus se genera gracias a la expresión de la proteína y genoma viral en algunas células, y el virus producido infectará a las células vecinas, propagándose. Por lo tanto, las transfecciones posteriores se realizaron con 1 y 2 µg de vector total y no con 500 ng, como estipula el protocolo de Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent. Por lo tanto, se continuó con la transfección de los vectores SegA\_pcDNA3.1 (+) y SegB\_pcDNA3.1 (+) bajo las mismas condiciones que el vector eGFP-HA.

### **3.3 Detectar la expresión de las proteínas virales luego de la transfección de los vectores que codifican los segmentos A y B del virus de la necrosis pancreática infecciosa.**

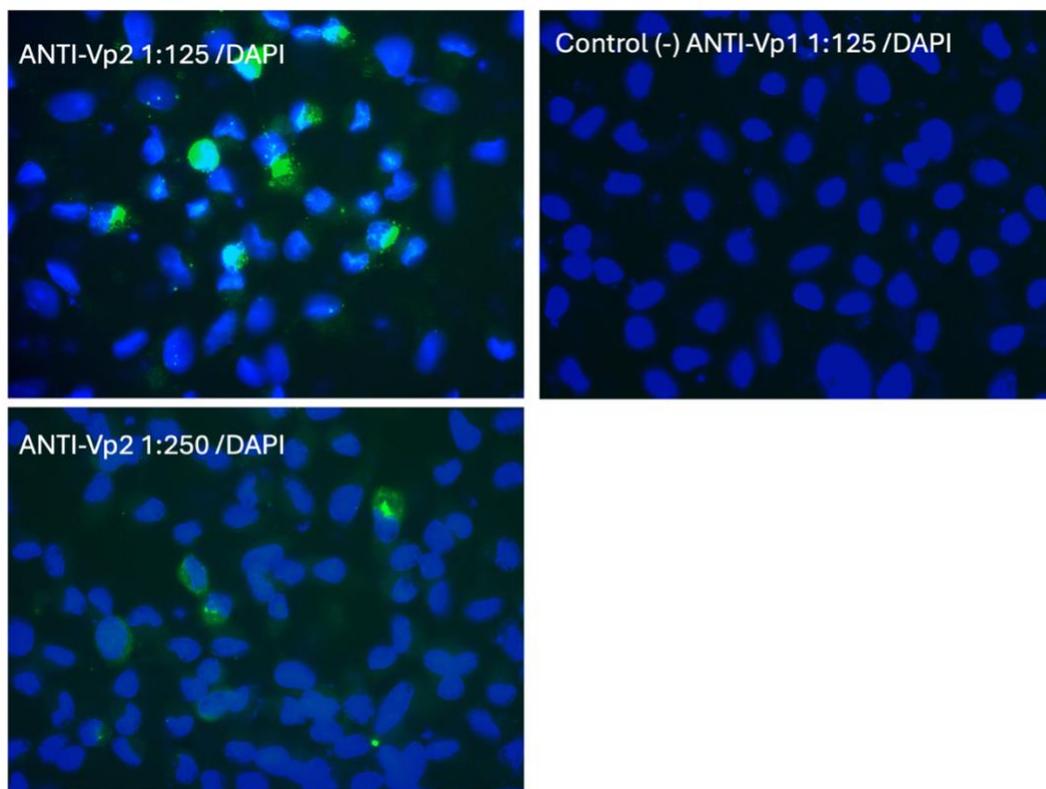
Para estandarizar los ensayos de inmunofluorescencia de las proteínas virales, las células CHSE-214 fueron infectadas y, a las 24 horas, se les realizó una inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo primario anti-Vp1 en diluciones de 1:500 y 1:1000, y un anticuerpo secundario acoplado a Alexa Fluor 594 en diluciones de 1:2000.



**Figura 12:** Inmunofluorescencia de células CHSE-214 infectadas con IPNV. La detección de proteínas se realizó a través de inmunofluorescencia indirecta a las 24 hpi; la expresión de Vp1 se detectó utilizando anticuerpo primario anti Vp1 en diluciones de 1:500 y 1:1000 y anticuerpo secundario acoplado a Alexa Flúor 594 en diluciones de 1:2000. n=1.

Como se observó en la figura 11, la dilución 1:500 del anticuerpo anti-Vp1 (1:500) permitió detectar la proteína Vp1, mientras que la dilución 1:1000 no fue suficiente para detectarla.

Paralelamente, se realizó la estandarización para el anticuerpo de la proteína Vp2. Las células CHSE-214 fueron infectadas y, a las 24 horas, se les realizó una inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo primario anti-Vp2 en diluciones de 1:250 y 1:125, y un anticuerpo secundario acoplado a Alexa Fluor 488 1:2000.

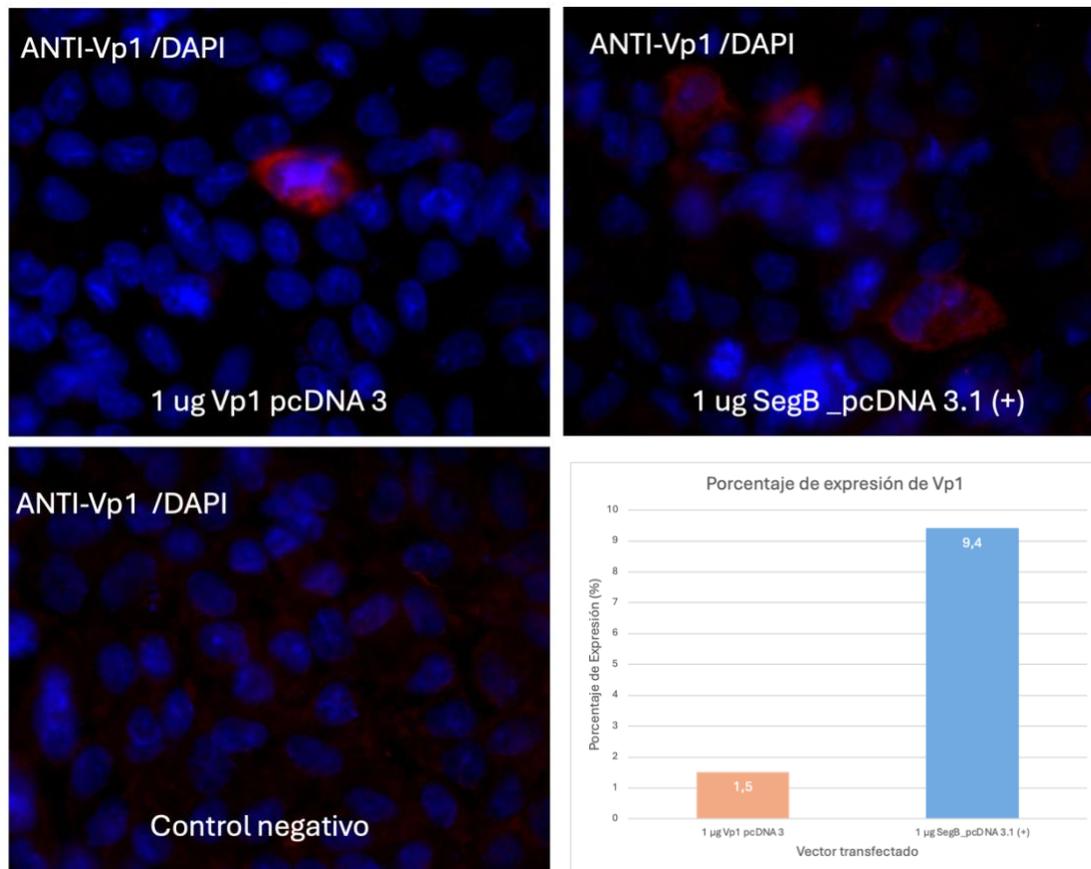


**Figura 13: Inmunofluorescencia de células CHSE-214 infectadas con IPNV. La detección de proteínas se realizó a través de inmunofluorescencia indirecta a las 24 hpi; la expresión de Vp2 se detectó utilizando anticuerpo primario anti Vp2 y anticuerpo secundario acoplado a Alexa Flúor 488 (1:2000). n=1.**

Como se observó en la figura 12, la dilución de 1:125 del anticuerpo anti-Vp2 permitió una mejor detección de Vp2 que la dilución de 1:250, por lo que se eligió esta dilución para los experimentos posteriores.

De la misma forma, se realizó un control transfectando los vectores que expresan la proteína Vp1 o Vp2, principalmente debido a que el anticuerpo anti-Vp2 es comercial y no es específico para una cepa viral en particular, por lo que se debe determinar si reconoce las distintas cepas que se diferencian en la región hipervariable de Vp2 (29). En particular, el virus utilizado es de la cepa HE y los vectores SegA\_pcDNA3.1 (+), SegB\_pcDNA3.1 (+), Vp1 pcDNA 3 y Vp2 pcDNA 3 provienen de la cepa Jasper.

En este experimento, se transfectó 1  $\mu$ g de los vectores SegA\_pcDNA3.1 (+), SegB\_pcDNA3.1 (+), Vp1 pcDNA 3 y Vp2 pcDNA 3.

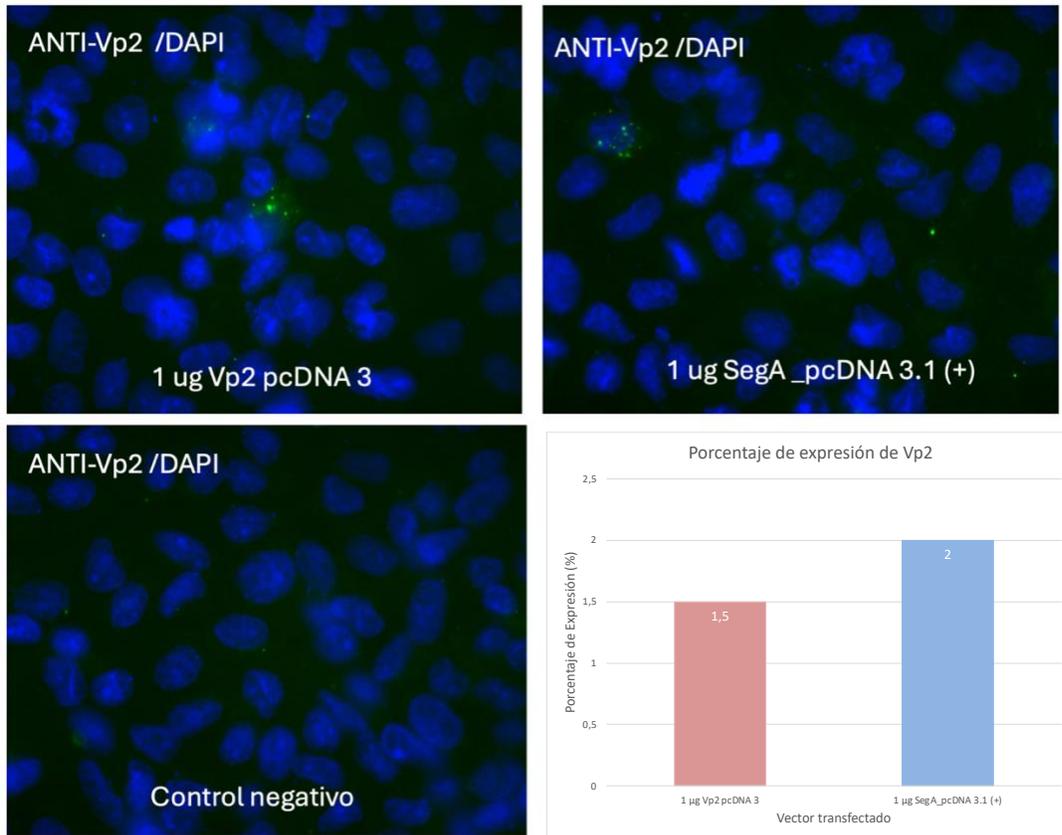


**Figura 14:** Inmunofluorescencia de células CHSE-214 transfectadas con los vectores SegB\_pcDNA 3.1 (+) y Vp1 pcDNA 3. La detección de proteínas se realizó a través de inmunofluorescencia indirecta a las 30 hpt; la expresión de Vp1 se detectó utilizando anticuerpo primario anti Vp1 (1:500); y el anticuerpo secundario para anti Vp1 está acoplado a Alexa Flúor 594 (1:2000). Se analizaron en total 121 células para la generación del gráfico de porcentaje de expresión de Vp1. n=1.

Como se observó en la figura 13, se detectó la proteína Vp1 tanto en la transfección de SegB\_pcDNA3.1 (+) como en la de Vp1 pcDNA3. Se realizó un gráfico del porcentaje de expresión de la proteína Vp1 en lugar de uno basado en el porcentaje de transfección, ya que este análisis, mediante inmunofluorescencia, identifica únicamente las células que expresan la proteína. Por lo tanto, este enfoque no permite evaluar directamente el rendimiento de transfección, ya que las células podrían estar transfectadas, pero el ARNm podría estar secuestrado en el núcleo o degradado en el citoplasma antes de ser

traducido a proteínas. Aparte, dado que ya se conocía que la transfección con eGFP-HA resultaba en un bajo porcentaje de transfección, se asumió que la detección de la proteína Vp1 sería aún menor, ya que eGFP, al ser una proteína autofluorescente, se detecta directamente a diferencia que una proteína detectada por inmunofluorescencia.

Posteriormente, se analizó la expresión de la proteína Vp2.

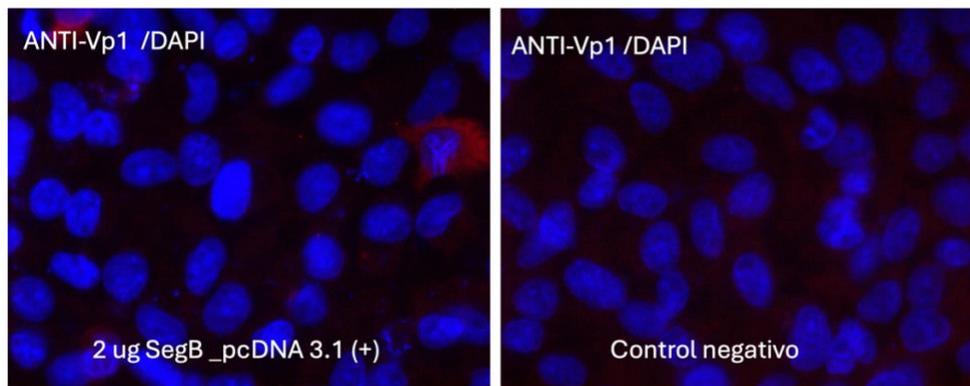


**Figura 15:** Inmunofluorescencia de células CHSE-214 transfectadas con los vectores SegA \_pcDNA 3.1 (+) y Vp2 pcDNA 3. La detección de proteínas se realizó a través de inmunofluorescencia indirecta a las 30 hpt; la expresión de Vp2 se detectó utilizando anticuerpo primario anti Vp2 (1:125) ; y el anticuerpo secundario Alexa Flúor 488 (1:2000). Se analizaron en total 116 células para la generación del gráfico de porcentaje de expresión de Vp2. n=1.

Como se observó en la figura 14, se detectó la proteína Vp2 tanto en la transfección de SegA \_pcDNA3.1 (+) como en la de Vp2 pcDNA3.1. Se realizó un gráfico del porcentaje de expresión de la proteína Vp2 en lugar de uno basado en el porcentaje de transfección,

ya que este análisis, mediante inmunofluorescencia, identifica únicamente las células que expresan la proteína. Por lo tanto, este enfoque no permite evaluar directamente el rendimiento de transfección, ya que las células podrían estar transfectadas, pero el ARNm podría estar secuestrado en el núcleo o degradado en el citoplasma antes de ser traducido a proteínas. Aparte, se asumió que, al igual que con la proteína Vp1, la detección de la proteína Vp2 podría ser limitada debido al bajo porcentaje de transfección asociado con eGFP-HA.

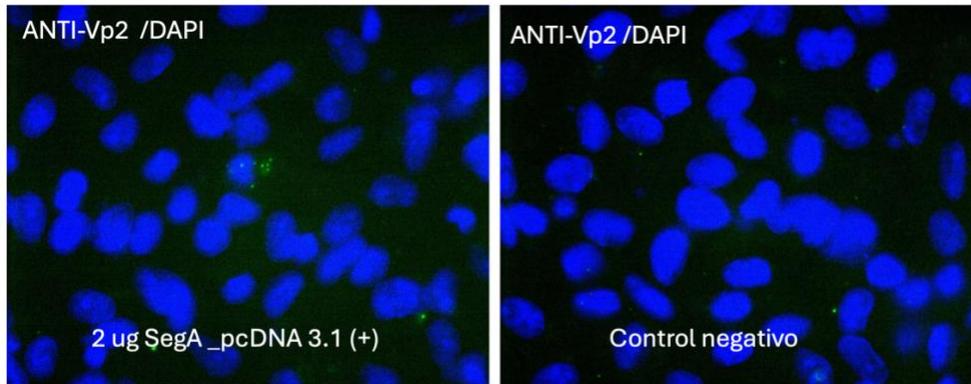
Posteriormente, para analizar si la transfección de mayor cantidad de ADN puede ser más eficiente, se realizó la inmunofluorescencia de la transfección de 2  $\mu$ g de los vectores SegA\_pcDNA3.1 (+), SegB\_pcDNA3.1 (+).



**Figura 16:** Inmunofluorescencia de células CHSE-214 transfectadas con los vectores SegB\_pcDNA 3.1 (+). La detección de proteínas se realizó a través de inmunofluorescencia indirecta a las 48 hpt; la expresión de Vp1 se detectó utilizando anticuerpo primario anti Vp1 (1:500); y el anticuerpo secundario Alexa Flúor 594 (1:2000). n=1.

Como se observó en la figura 15, se detectó la proteína Vp1 luego de la transfección de SegB\_pcDNA3.1 (+). Dado que ya se conocía que la transfección con eGFP-HA daba como resultado un bajo porcentaje de transfección, se asumió que la detección de la proteína Vp1 sería aún menor, ya que eGFP, al ser una proteína autofluorescente, es detectada directamente, a diferencia que una proteína detectada por inmunofluorescencia.

Posteriormente, se analizó la expresión de la proteína Vp2.



**Figura 17:** Inmunofluorescencia de células CHSE-214 transfectadas con vectores SegA\_pcDNA 3.1 (+). La detección de proteínas se realizó a través de inmunofluorescencia indirecta a las 48 hpt; la expresión de Vp2 se detectó utilizando anticuerpo primario anti Vp2 (1:125); y el anticuerpo secundario Alexa Flúor 488 (1:2000). n=1.

Como se observó en la figura 16, se detectó la proteína Vp2 luego de la transfección de SegA\_pcDNA3.1 (+). Se asumió que, al igual que con la proteína Vp1, la detección de la proteína Vp2 podría ser limitada debido al bajo porcentaje de transfección asociado con eGFP-HA.

Con estos resultados de inmunofluorescencia se determinó que se logra detectar las proteínas luego de ambas transfecciones, tanto con el segmento A como con el segmento B y con las dos concentraciones 1 µg y 2 µg de vector, por lo que se prosiguió a realizar los pasajes del sobrenadante para la infección del virus resultante.

### **3.4. Pasajes sucesivos del lisado de las células transfectadas**

Se transfectaron células en una placa de 24 pocillos con 500 ng del vector SegA\_pcDNA3.1 (+) y 500 ng del vector SegB\_pcDNA3.1 (+), completando 1 µg de vector total, denominado "virus 500", y con 1 µg del vector SegA\_pcDNA3.1 (+) y 1 µg del vector SegB\_pcDNA3.1 (+), completando 2 µg de vector total, denominado "virus 1000". Estas células se mantuvieron a 22 °C durante las primeras 24 horas, y posteriormente se disminuyó gradualmente la temperatura hasta llegar a los 18 °C.

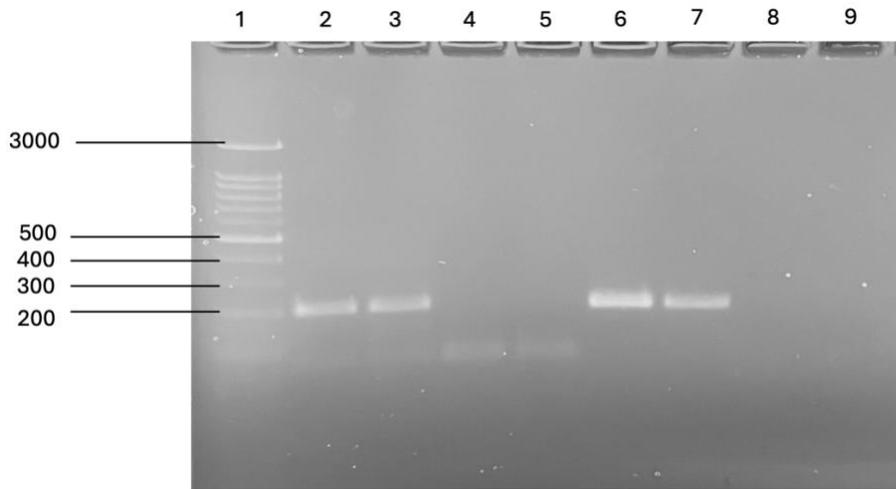
Las células se mantuvieron durante 10 días, siguiendo las condiciones descritas en estudios previos (24,26,31), en los que se evaluó la acumulación de ARNm viral y proteínas asociadas a la replicación viral. En cada uno de los pasajes, se incluyó un control negativo, mientras que en otra placa se realizó una infección con la cepa HE de IPNV como control positivo.

Para determinar la presencia de ARNm viral, se llevó a cabo una extracción del material genético y se identificó ARN codificante para la proteína Vp2 mediante RT-PCR en cada pasaje celular. Los análisis se realizaron cada 10 días o cuando se detectaba efecto citopático (ECP), lo que indicaba actividad viral.

Un pasaje viral consiste en transferir el sobrenadante de células previamente transfectadas o infectadas a una nueva placa de células, permitiendo evaluar la continuidad de la transcripción y posible síntesis de proteínas virales. En este caso, las células transfectadas fueron lisadas mediante ciclos de congelación y descongelación, seguidos de la separación de residuos celulares por centrifugación. El sobrenadante resultante se utilizó para inocular nuevas células.

El sobrenadante obtenido se evaluó en dos condiciones: una dilución 1/10 y otra sin diluir (100%). Esto permitió analizar si existía algún efecto citotóxico asociado al uso del sobrenadante puro. No se observó efecto citotóxico en las células tratadas con el sobrenadante al 100%, por lo que esta concentración se utilizó en los pasajes siguientes (datos no mostrados).

En los primeros pasajes de las condiciones "virus 500" y "virus 1000", no se logró detectar la presencia de ARNm de Vp2 mediante RT-PCR. Sin embargo, en el pasaje 3 del "virus 500", se identificó el ARNm codificante para la proteína Vp2, lo que se observa en la figura 17.



**Figura 18: Detección de Vp2 por RT- PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Carril 1: AccuRuler 100 bp Plus DNA; Carril 2: P3 del virus 500; Carril 3: P3 del virus 500; Carril 4: P3 del virus 500 control; Carril 5: P3 del virus 500 control; Carril 6: ARN genómico viral; Carril 7: ARN genómico viral; Carril 8: Control negativo RT-PCR; Carril 9: Control negativo RT-PCR. n=1.**

Esto sugiere que, al no haber evidencia previa de expresión, el ARNm viral de Vp2 comenzó a acumularse y a ser detectable después de varios pasajes, lo que sugiere que hay reconstitución del virus que infectó y se amplificó en cada pasaje.

El enfoque principal de estos experimentos fue determinar la presencia del ARNm viral en los pasajes celulares sucesivos, lo que podría indicar la continuidad en la expresión de proteínas virales. La presencia de ARNm de Vp2 en los pasajes posteriores confirma que el material genético y, por ende, las proteínas asociadas, se transfieren efectivamente a las nuevas células en cada ciclo.

#### 4. Discusión

En la presente investigación se usaron vectores de ADN que contiene el genoma de IPNV flanqueado por ribozimas para reconstruir al virus mediante su introducción en células CHSE-214. Existen varios métodos para la incorporación de vectores dentro de una célula, como la transfección, basados en lípidos y otras no liposomales, como la electroporación (36). Sin embargo, ninguna de estas técnicas ha logrado altos porcentajes de transfección en líneas celulares de salmónidos (31). Tal como se observó en los resultados, el porcentaje de transfección utilizando liposomas no superó el 13,8% con el vector eGFP-HA, sin embargo, este porcentaje puede variar, según los vectores que se transfecten. No obstante, se propone que esto no es un obstáculo para la obtención del virus, dado que al transfectar los vectores que contienen los segmentos A y B del virus, las proteínas virales encapsidarán el genoma viral y formarán partículas virales. Una vez generadas, las partículas virales lisarán las células transfectadas, liberándose al sobrenadante, infectando a las células vecinas. Sin embargo, es importante lograr un porcentaje mínimo de transfección para asegurar que se genere la máxima expresión de las proteínas, de acuerdo con los protocolos de transfección, y se produzca una acumulación de las proteínas. Esto permite que se generen suficientes partículas virales capaces de infectar a las células circundantes.

Debido a que las ribozimas Hammerhead (HH) y la del virus de la hepatitis delta (VHD), se encuentran en los extremos 5' y 3', respectivamente, del ARN mensajero (ARNm) del segmento A y del segmento B, que son sintetizados por la ARN polimerasa II, provocan un corte que resulta en la pérdida de la cap (caperuza 7-metilguanilato) y de la cola de poli A, luego de la transcripción de los ADNs virales en el núcleo celular. Como resultado de esta modificación, se genera un ARN similar al viral. Sin embargo, al perder la cap y no contar con la proteína Vpg en reemplazo, que es la encargada de reclutar la maquinaria traduccional en este virus, este ARNm no se traduce con la misma eficacia.

Como se mencionó previamente, las líneas células de salmones no son fácilmente transfectables (37). En un estudio que buscaba optimizar un protocolo de transducción de Lentivirus para la integración eficiente de constructos en el genoma de CHSE-214, se

observó que, al aumentar la temperatura de incubación de las células transfectadas a 22 °C, se mejora la eficiencia de transfección (33). Esto podría atribuirse a la naturaleza de su bicapa lipídica semipermeable, la cual al aumentar la temperatura podría volverse más permeable, facilitando la entrada del vector a la célula. Dado que las primeras 24 horas son críticas para lograr la expresión óptima y la captación celular del material transfectado, se mantuvieron las células a 22 °C durante este período inicial. Posteriormente, la temperatura se redujo progresivamente a la temperatura estándar, ya que una exposición prolongada podría inducir apoptosis en las células (33).

Con respecto al análisis de la inmunofluorescencia (IF), una técnica inmunológica para detectar una proteína a través de anticuerpos específicos es importante mencionar que ninguna técnica de IF alcanza una sensibilidad del 100% debido a las características que presenta. La variabilidad en la afinidad de los anticuerpos primario y secundario, junto con posibles limitaciones en la permeabilización y fijación de las células, no permite una detección de todos los antígenos presentes en la muestra. Además, factores como el fotoblanqueo de los fluoróforos, la autofluorescencia de las muestras y las variaciones en la expresión del antígeno afectan en la observación, reduciendo la sensibilidad total de la técnica. Estos factores limitan la capacidad de la IF para detectar todas las proteínas blanco en una muestra, por lo tanto, es probable que haya más proteínas en las células que las detectadas por esta técnica.

Luego de la transcripción de los segmentos transfectados, las ribozimas se estructurarán y generarán los cortes específicos necesarios para que el ARNm viral comience con dos guaninas y termine con dos citosinas. Estos ARNm se traducirán generando las proteínas virales. La aparición de Vp1 permitirá la síntesis de ARN viral, tanto transcrito como genómico. Los transcritos virales serán traducidos para ser traducidos a las proteínas virales VP1, 2, 3 4, y 5. La acumulación de VP1 permitirá una mayor síntesis de transcritos virales y de genoma viral. El genoma será reconocido por Vp2, lo que llevará a su encapsidación y a la obtención de las partículas virales infectivas. Estas partículas saldrán de la célula y se encontrarán en el sobrenadante del cultivo celular, que será utilizado para infectar en sucesivos pasajes a nuevas células CHSE-214 para amplificar

el virus. En cada pasaje del virus en una nueva línea celular, se espera una amplificación de la progenie viral.

Para aumentar la eficiencia de infección de los pasajes, algunos autores (26,34) sugieren realizar una lisis celular para lograr obtener los virus que se encuentran dentro de las células y así aumentar la cantidad de virus infecciosos. En este caso, la lisis celular por congelación y descongelación es una técnica muy utilizada para romper las membranas celulares y liberar el contenido intracelular. Este proceso implica la congelación de las células, lo que provoca la formación de cristales de hielo dentro de ellas, generando presión que daña las membranas celulares. Al descongelarse rápidamente, los cristales de hielo se derriten y el choque térmico adicional causa más rupturas en la membrana. Aunque es un método simple y eficiente, puede haber variabilidad en su efectividad (38): Cabe destacar que, al ser IPNV un virus desnudo, y muy estable a distintas temperaturas (39) su infectividad no se ve afectada por este proceso.

Existen distintas técnicas para amplificar el virus proveniente de la genética reversa, en las que los tiempos de incubación entre pasajes varían dependiendo tanto del virus como de la línea celular utilizada. Con algunas técnicas de amplificación, se logró detectar el ARN o ADN de la proteína en el pasaje 2, y en otros casos, recién se logró detectar en el pasaje 6 (24,26,31,34); sin embargo, cada estudio utilizó técnicas de recuperación distintas. Por un lado, para la entrega del material genético a las células, algunos utilizaron sistemas de transfección no liposomales (31,34), mientras que otros emplearon sistemas de liposomas (24,26,40,41). En algunos estudios, se optó por congelar y descongelar las muestras con el fin de inducir lisis celular (26,34), mientras que otros utilizaron los sobrenadantes celulares directamente en el traspaso. Entre estos últimos, algunos realizaron centrifugaciones (31,40,41) y uno no dio a conocer esta información (24).

Los tiempos de infección también variaron, ya que cada línea celular requiere condiciones específicas de mantenimiento para optimizar los resultados. Por ejemplo, los estudios realizados en líneas celulares de mamíferos se esperaron entre 24 horas a 48 horas luego del pasaje (26,31,34,40), mientras que en líneas celulares de peces, como en el caso de salmónidos, los tiempos de espera fueron de 4 a 10 días (24,41). Aunque los virus

estudiados eran de genoma de ARN, el tipo de vectores que se usaron en la transfección también fue variable; algunos autores utilizaron directamente el transcrito *in vitro* (24,40), mientras que otros emplearon vectores de ADN (26,34,41)

La detección del ARN que codifica para la proteína de interés de los distintos virus también ha sido variable. Por un lado, algunos estudios mostraron la obtención en el primer pasaje (31,41), otros detectaron ECP en el pasaje 2 sin especificar en qué pasaje se realizó el RT-PCR (24), y otro estudio observó ECP en el pasaje 3 (26).

En esta tesis, se transfectó con dos cantidades de virus, esperando que una de ellas produjera mejores resultados. Al realizar los pasajes se observó que no hubo efecto citotóxico de las células lisadas no infectadas, lo cual fue inesperado, ya que se anticipaba citotoxicidad debido a los restos celulares presentes en el sobrenadante, como proteínas celulares e interferón. Estas moléculas, conocidas como DAMPs (Danger-Associated Molecular Patterns), son liberadas por células dañadas o en estrés y activan inflamación al interactuar con receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) en las células (42). Por lo tanto, se esperaba que el sobrenadante, rico en DAMPs, indujera citotoxicidad, activando vías inflamatorias o estrés celular. Sin embargo, la ausencia de este efecto sugiere que las moléculas presentes no alcanzaron niveles suficientes o que las células no activaron los PRRs. Esto permitió usar el 100% del sobrenadante sin comprometer la viabilidad celular para los pasajes siguientes.

En esta tesis se logró detectar el ARNm de Vp2 en el pasaje 3 del "virus 500", lo que, comparado con los estudios de genéticas reversas anteriores, es lo que se podría esperar.

La detección del ARNm de Vp2, implica que este debería estar siendo sintetizado por la polimerasa viral, Vp1. Esto indicaría que no solo se está acumulando el ARNm de Vp2, sino que también el de Vp1 y que este se estaría traduciendo a la proteína Vp1. Más aún, estos ARNm y la Vp1 deberían estar aumentando en cantidad en cada uno de los pasajes sucesivos, lo que explicaría por qué no fueron detectados en pasajes anteriores. Si la detección del ARNm de Vp2 se debiera a una contaminación con ADN plasmidial o con el transcrito original sintetizado por la ARN polimerasa II, éste debería haber sido

detectado tan pronto como en el pasaje 1, ya que en los pasajes sucesivos no podría entrar a la célula.

Esto plantea la posibilidad de que el ARNm de Vp2 esté siendo transportado por vesículas extracelulares (EVs), un mecanismo conocido por varios virus, como el SARS-CoV-2, el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus del Zika. Estas EVs, pequeñas partículas rodeadas por membranas, pueden transportar ARNm a células no infectadas, facilitando la diseminación viral y la evasión del sistema inmunológico (43). Sin embargo, si efectivamente existieran vesículas que transporten el ARNm de Vp2, esto implicaría la presencia de proteínas virales que promuevan la generación de las EVs. Lo que implicaría que este ARNm debió haberse detectado en los pasajes anteriores. Por otro lado, hasta la fecha, no se ha documentado que la familia *Birnaviridae* sea capaz de generar este fenómeno.

Para evaluar la posibilidad de que las EVs sean generadas por las proteínas virales, se propone transfectar el ARNm del segmento A junto con vectores que codifiquen exclusivamente para las proteínas del segmento B, como VP1, y transfectar el ARNm del segmento B junto con vectores que codifiquen únicamente para las proteínas del segmento A, como VP2, VP4 y VP3. Este diseño experimental funcionaría como un control, ya que, si alguna de estas proteínas individuales fuera capaz de inducir la formación de EVs, se esperaría detectar el ARNm transportado por dichas vesículas. No obstante, en este contexto no se formarían partículas virales completas, dado que no estarían presentes todas las proteínas esenciales para el ensamblaje del virión.

Por último, los resultados también muestran que las ribozimas están funcionando correctamente, ya que hay traducción de los ARN mensajeros. Esto implica la obtención del ARN viral que es reconocido por VP1 interaccionando con las dos citosinas necesarias para su replicación. Aun así, es necesario realizar experimentos adicionales para confirmar la presencia de partículas virales. Entre estos, la microscopía electrónica, que permitiría visualizar directamente las partículas virales y evaluar su morfología y tamaño. Además, sería fundamental llevar a cabo ensayos de título viral, como la cuantificación de unidades formadoras de placa (PFU) en células, para medir la

capacidad infectiva del virus y determinar si las partículas generadas son funcionales y capaces de infectar nuevas células.

Los resultados de este trabajo tienen el potencial de contribuir significativamente al entendimiento del ciclo replicativo del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) y de mejorar las herramientas de genética reversa utilizadas en su estudio. Por ejemplo, podría permitir identificar con precisión la serina específica en la que la proteína viral Vp1 se autofosforila (44), un proceso crítico para la síntesis del ARN viral o el mecanismo de procesamiento de la proteasa Vp4, esencial para la generación de las proteínas virales.

Estos hallazgos serían un avance fundamental en la comprensión de los mecanismos moleculares que regulan la replicación del virus y abrirían la posibilidad de desarrollar estrategias dirigidas a inhibir la polimerasa de este virus.

Además, este trabajo podría sentar las bases para diseñar herramientas más eficientes en el control de brotes virales en la industria acuícola. Una mejor comprensión de los mecanismos de replicación del IPNV y la optimización de sistemas de genética reversa permitirían el desarrollo de vacunas más efectivas y métodos de diagnóstico más precisos, ayudando a mitigar las pérdidas económicas asociadas a esta enfermedad.

Finalmente, los resultados podrían establecer un marco de referencia para la aplicación de estas tecnologías a otros virus de interés. Este enfoque tiene el potencial de contribuir tanto al avance de la investigación en la virología como al desarrollo de aplicaciones biotecnológicas en el ámbito de la acuicultura y en otros sectores relevantes.

## 5. Conclusión

Se detectó la expresión de las proteínas virales Vp1 y Vp2 tras la transfección con 1 µg y 2 µg de los vectores que codifican los segmentos A y B del IPNV, confirmando la funcionalidad de los vectores y su expresión.

Se detectó el ARNm de Vp2 en el pasaje 3 del “virus 500”.

Debe confirmarse la obtención de viriones de IPNV mediante experimentos de titulación viral y visualización por microscopía electrónica.

La próxima fase del proyecto debería enfocarse en optimizar las condiciones de transfección y pasaje viral, con el fin de lograr una mayor acumulación y expresión del ARNm viral, lo que a su vez podría llevar a la producción efectiva de partículas virales. El avance en este sentido es fundamental para poder prosperar en la caracterización del ciclo viral y en la evaluación de posibles aplicaciones en el estudio de la biología molecular de este virus.

Además, la investigación podría contribuir a la creación de terapias antivirales dirigidas a interferir con etapas críticas del ciclo viral, reduciendo el impacto de IPNV en la industria acuícola. Este enfoque también podría extenderse a otros patógenos de interés, promoviendo avances en la virología molecular y en la biotecnología aplicada a la salud animal.

## 6. Referencias

1. Fayaz I, Bhat RAH, Tandel RS, Dash P, Chandra S, Dubey MK, et al. Comprehensive review on infectious pancreatic necrosis virus. Vol. 574, Aquaculture. Elsevier B.V.; 2023.
2. TechnoPress & SalmonChile. La Acuicultura en Chile. 2003.
3. Godoy M, Kibenge MJT, Montes de Oca M, Pontigo JP, Coca Y, Caro D, et al. Isolation of a New Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) Variant from Genetically Resistant Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*) during 2021–2022. *Pathogens*. 2022 Nov 1;11(11).
4. Benkaroun J, Muir KF, Allshire R, Tamer C, Weidmann M. Isolation of a New Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) Variant from a Fish Farm in Scotland. *Viruses*. 2021 Feb 28;13(3):385.
5. Hillestad B, Johannessen S, Melingen GO, Moghadam HK. Identification of a New Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) Variant in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) that can Cause High Mortality Even in Genetically Resistant Fish. *Front Genet*. 2021 Nov 26;12.
6. Wolf K. *Fish Viruses and Fish Viral Diseases*. Ithaca, NY: Cornell University Press; 1988.
7. Dobos P. THE MOLECULAR BIOLOGY OF INFECTIOUS PANCREATIC NECROSIS VIRUS (IPNV). Vol. 5, Pergamon Annual Review of Fish Diseases. 1995.
8. Dobos P. Virus-specific protein synthesis in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. *J Virol*. 1977 Jan;21(1):242–58.
9. Saint-Jean SR, Borrego JJ, Perez-Prieto SI. Infectious Pancreatic Necrosis Virus: Biology, Pathogenesis, and Diagnostic Methods. In 2003. p. 113–65.
10. Munro ES, Gahlawat SK, Acosta F, Ellis AE. 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 Dis*. 2006 Jan 12;29(1):43–8.
11. Magyar G, Chung HK, Dobos P. Conversion of VP1 to VPg in Cells Infected by Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *Virology*. 1998 May;245(1):142–50.
12. Duncan R, Mason CL, Nagy E, Leong JA, Dobos P. Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus genome segment B and its encoded VP1 protein: A putative RNA-dependent RNA polymerase lacking the Gly-Asp-Asp motif. *Virology*. 1991 Apr;181(2):541–52.
13. Granzow H, Weiland F, Fichtner D, Enzmann PJ. Studies of the ultrastructure and morphogenesis of fish pathogenic viruses grown in cell culture. *J Fish Dis*. 1997 Jan 31;20(1):1–10.
14. Hong JR, Gong HY, Wu JL. IPNV VP5, a novel anti-apoptosis gene of the Bcl-2 family, regulates Mcl-1 and viral protein expression. *Virology*. 2002;295(2):217–29.
15. Shao L, Zhao J, Tang Q. Non-muscle myosin heavy chain 9 is a critical factor for infectious pancreatic necrosis virus cellular entry. *Aquaculture*. 2021 Feb 25;533.
16. Levican J, Miranda-Cárdenas C, Soto-Rifo R, Aguayo F, Gaggero A, León O. Infectious pancreatic necrosis virus enters CHSE-214 cells via macropinocytosis. *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(1).
17. Cortez-San Martín M, Villanueva RA, Jashés M, Sandino AM. Molecular characterization of IPNV RNA replication intermediates during the viral infective cycle. *Virus Res*. 2009 Sep;144(1–2):344–9.
18. Graham SC, Sarin LP, Bahar MW, Myers RA, Stuart DI, Bamford DH, et al. The N-Terminus of the RNA polymerase from infectious pancreatic necrosis virus is the determinant of genome attachment. *PLoS Pathog*. 2011 Jun;7(6).

19. Dopazo CP. The infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and its virulence determinants: What is known and what should be known. Vol. 9, Pathogens. MDPI AG; 2020.
20. Dobos P, Roberts TE. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus: a review. *Can J Microbiol.* 1983 Apr 1;29(4):377–84.
21. Rivas-Aravena A, Muñoz P, Jorquera P, Diaz A, Reinoso C, Catrilebún SG, et al. Study of RNA-A Initiation Translation of The Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *Virus Res.* 2017 Aug 15;240:121–9.
22. González-Catrilebún S, Cartagena J, Vargas D, Breguel-Serrano P, Sandino AM, Rivas-Aravena A. The RNA-dependent RNA polymerase of the infectious pancreatic necrosis virus is linked to viral mRNA acting as a cap substitute. *Journal of General Virology.* 2022;103(3).
23. Boot HJ. Modifications of the 3'-UTR stem-loop of infectious bursal disease virus are allowed without influencing replication or virulence. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jan 2;32(1):211–22.
24. Yao K, Vakharia VN. Generation of Infectious Pancreatic Necrosis Virus from Cloned cDNA. Vol. 72, *JOURNAL OF VIROLOGY.* 1998.
25. Zhang Z, Dong M, Yang F, Wang Z. Liposome Induced Mechanical Properties Changes in Cell Membrane. In: 2019 IEEE International Conference on Manipulation, Manufacturing and Measurement on the Nanoscale (3M-NANO). IEEE; 2019. p. 202–5.
26. Qi X, Gao Y, Gao H, Deng X, Bu Z, Wang X, et al. An improved method for infectious bursal disease virus rescue using RNA polymerase II system. *J Virol Methods.* 2007 Jun;142(1–2):81–8.
27. Deng J, Shi Y, Peng X, He Y, Chen X, Li M, et al. Ribocentre: a database of ribozymes. *Nucleic Acids Res.* 2023 Jan 6;51(D1):D262–8.
28. Scott WG, Finch JT, Klug A. The Crystal Structure of an AII-RNA Hammerhead Ribozyme: A Proposed Mechanism for RNA Catalytic Cleavage. Vol. 81, *Cell.* 1995.
29. Been MD. HDV Ribozymes. Vol. 307, CTMI. Springer-Verlag; 2006.
30. Modahl LE, Macnaughton TB, Zhu N, Johnson DL, Lai MMC. RNA-Dependent Replication and Transcription of Hepatitis Delta Virus RNA Involve Distinct Cellular RNA Polymerases. Vol. 20, *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY.* 2000.
31. Ben Abdeljelil N, Khabouchi N, Mardassi H. Efficient rescue of infectious bursal disease virus using a simplified RNA polymerase II-based reverse genetics strategy. *Arch Virol.* 2008 Jun;153(6):1131–7.
32. Goswami M, Yashwanth BS, Trudeau V, Lakra WS. Role and relevance of fish cell lines in advanced in vitro research. *Mol Biol Rep.* 2022 Mar 11;49(3):2393–411.
33. Gratacap RL, Regan T, Dehler CE, Martin SAM, Boudinot P, Collet B, et al. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing in a salmonid fish cell line using a lentivirus delivery system. *BMC Biotechnol.* 2020 Dec 23;20(1):35.
34. Mosley YYC, Wu CC, Lin TL. Infectious bursal disease virus rescued efficiently with 3' authentic RNA sequence induces humoral immunity without bursal atrophy. *Vaccine.* 2013 Jan 11;31(4):704–10.
35. HEPPELL J, TARRAB E, LECOMTE J, BERTHIAUME L, ARELLA M. Strain Variability and Localization of Important Epitopes on the Major Structural Protein (VP2) of Infectious Pancreatic Necrosis Virus1. *Virology.* 1995 Dec;214(1):40–9.
36. The inside scoop—evaluating gene delivery methods [Internet]. 2005. Available from: <http://www.nature.com/naturemethods>

37. Romøren K, Pedersen S, Smistad G, Evensen Ø, Thu BJ. The influence of formulation variables on in vitro transfection efficiency and physicochemical properties of chitosan-based polyplexes. *Int J Pharm.* 2003 Aug 11;261(1–2):115–27.
38. Shehadul Islam M, Aryasomayajula A, Selvaganapathy P. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines (Basel).* 2017 Mar 8;8(3):83.
39. Mortensen S, Nilsen R, Hjeltnes B. Stability of an infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) isolate stored under different laboratory conditions. *Dis Aquat Organ.* 1998;33:67–71.
40. Mundt E, Vakhariat VN. Synthetic transcripts of double-stranded Birnavirus genome are infectious [Internet]. Vol. 93. 1996. Available from: <https://www.pnas.org>
41. Moriette C, LeBerre M, Lamoureux A, Lai TL, Brémont M. Recovery of a Recombinant Salmonid Alphavirus Fully Attenuated and Protective for Rainbow Trout. *J Virol.* 2006 Apr 15;80(8):4088–98.
42. Patel S. Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs): the Derivatives and Triggers of Inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2018 Nov 28;18(11):63.
43. Xia X, Wang Y, Zheng JC. Emerging roles of extracellular vesicles in mediating RNA virus infection. *Fundamental Research.* 2021 Mar;1(2):179–85.
44. Xu HT, Si WD, Dobos P. Mapping the site of guanylation on VP1, the protein primer for infectious pancreatic necrosis virus RNA synthesis. *Virology.* 2004 Apr 25;322(1):199–210.

Todas las imágenes utilizadas en este informe son de creación propia utilizando la herramienta BioRender.com

## Figuras Suplementaria

Figura suplementaria 1. Mapa del vector SegA\_pcDNA3.1 (+).

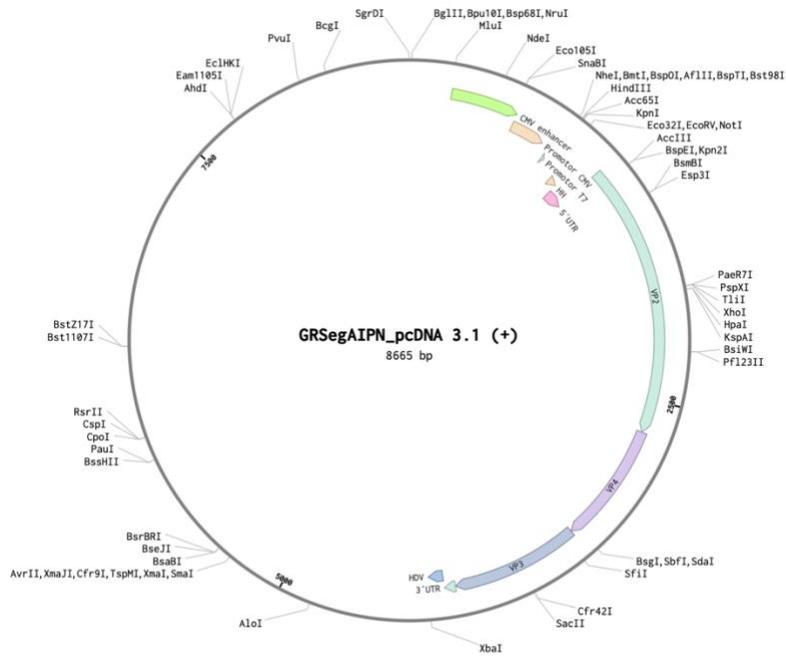


Figura suplementaria 2. Mapa del vector Segb\_pcDNA3.1 (+).

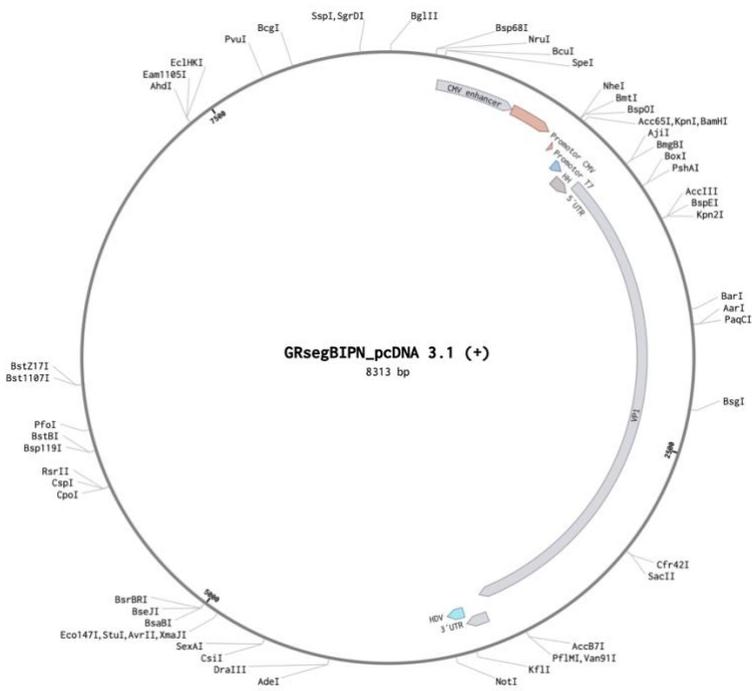




Figura suplementaria 5. Mapa del vector eGFP-HA

