



Facultad de ciencias

Departamento de Biología Molecular

ESTUDIO DEL ESTABLECIMIENTO DE INFECCIONES PERSISTENTES POR PARTE DEL VIRUS DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV)

TESIS DOCTORAL

Laura Broto Campo

Madrid, 2022

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid

ESTUDIO DEL ESTABLECIMIENTO DE INFECCIONES PERSISTENTES POR PARTE DEL VIRUS DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV)

Memoria de tesis doctoral presentada por Laura Broto
Campo, graduada en Biotecnología, para optar al título de
Doctora en Biología Molecular por la Universidad
Autónoma de Madrid.

Director de tesis:

José Francisco Rodríguez Aguirre

Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC)

Madrid, 2022

El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular y Celular del centro Nacional de Biotecnología (CNB) del consejo superior de Investigaciones Científicas (CSIC) bajo la supervisión del Dr. José Francisco Rodríguez Aguirre.

La realización de esta tesis ha sido posible gracias a la obtención de un contrato de colaboración con la empresa Syva S.A.U.

Madrid, 2022

Fdo.: Dr. José Francisco Rodríguez Aguirre

RESUMEN

El virus de la bursitis infecciosa (IBDV), el virus mejor caracterizado de la familia *Birnaviridae*, es un virus icosaédrico desnudo cuyo genoma está formado por RNA de doble cadena (dsRNA) que se encapsida formando complejos ribonucleoproteicos (RNPs). Los RNPs incluyen el polipéptido VP3, que se une al dsRNA y la RNA polimerasa viral (RdRp) (VP1). IBDV es un importante patógeno aviar que afecta a los pollos jóvenes de gallina doméstica (*Gallus Gallus*) causando grandes pérdidas a la industria avícola. La enfermedad causada por IBDV, denominada bursitis infecciosa o enfermedad de Gumboro, se caracteriza por una destrucción masiva de linfocitos B inmaduros en la bolsa de Fabricio y el desencadenamiento de una potente tormenta de interleuquinas que puede causar la muerte. Se ha determinado que algunos individuos supervivientes aparentemente sanos desarrollan infecciones persistentes. Por otra parte, se ha identificado la presencia de infecciones persistentes de IBDV en individuos asintomáticos pertenecientes a diferentes especies de aves silvestres. En ambos casos, la persistencia viral puede jugar un papel de gran importancia en la diseminación y en el establecimiento de reservorios incontrolados del virus.

Hasta el momento no se han descritos los mecanismos moleculares que conducen al establecimiento de la persistencia de IBDV. En este trabajo se describe por primera vez una aproximación experimental que permite el desarrollo de infecciones persistentes en líneas celulares estables, así como una caracterización a nivel viral y celular de la persistencia. En particular, el trabajo se ha centrado en el estudio de la infección persistente en células aviares DF-1. Los datos presentados indican que la persistencia no provoca alteraciones significativas en el genoma ni en la capacidad de replicación del virus. Sin embargo, los resultados obtenidos indican que el establecimiento de la persistencia está asociado a la pérdida de la capacidad de la respuesta a interferón de tipo I y al desarrollo de un mecanismo(s) de origen viral, probablemente asociado a la acumulación de genomas defectivos, que reduce de forma drástica la replicación del virus.

ABSTRACT

Infectious bursal disease virus (IBDV), the best characterized virus of *Birnaviridae* family, is a naked icosahedral virus with double-stranded RNA (dsRNA) genome, which is encapsidated as ribonucleoprotein complexes (RNPs). RNPs include the VP3 polypeptide, which binds to dsRNA, and the viral RNA polymerase (RdRp) (VP1). IBDV is an important avian pathogen that affects young chickens of domestic hen (*Gallus Gallus*), and is the responsible of great losses in the poultry industry. The disease caused by IBDV, called infectious bursal disease or Gumboro disease, is characterized by massive destruction of immature B lymphocytes in the bursa of Fabricius and the induction of a powerful interleukin storm that can cause death. Apparently healthy surviving individuals have been found to develop persistent infections. Additionally, the presence of persistent IBDV infections in asymptomatic individuals belonging to different species of wild birds has been identified. In both cases, viral persistence can play a very important role in the spread and establishment of uncontrolled reservoirs of the virus.

At the present time the molecular mechanisms leading to the establishment of IBDV persistence have not been described. In this work, an experimental approach, that allows the development of persistent infections in stable cell lines, has been described for the first time, as well as a characterization at the viral and cellular levels of persistent infections. In particular, the work has focused on the study of persistent infection in avian DF-1 cells. The presented data indicate that persistence does not cause significant alterations in the genome or in the replication capacity of the virus. However, the results obtained indicate that the establishment of persistence is associated with the loss of the capacity to respond to type I interferon and the development of a viral mechanism(s), probably associated with the accumulation of defective viral genomes, which drastically reduces virus replication.

Índice de contenido:

RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	5
ABREVIATURA.....	13
INTRODUCCIÓN.....	20
1. Taxonomía.....	20
2. Estructura genómica de IBDV.....	20
3. Estructura de la partícula viral.....	22
4. Tropismo, patogenia y vacunas.....	23
5. Ciclo viral de IBDV.....	25
5.1 Transcripción/Replicación del genoma de IBDV.....	26
6. IBDV y Sistema Inmune.....	27
6.1 Apoptosis	27
6.1.2 Apoptosis e infecciones por IBDV.....	27
6.2 Interferón e inmunidad innata.....	28
6.2.1 Receptores de reconocimiento de patrones (PRR).....	29
6.2.2 Ruta Janus kinase-signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT)	29
6.3 Interacción de IBDV con la respuesta inmune innata.....	32
7. Infecciones persistentes.....	32
7.1 Infecciones persistentes en Birnavirus.....	33
7.2 Características generales de las infecciones persistentes.....	33
8. Genomas virales defetivos.....	34
8.1 Tipos de DVGs.....	35
8.2 Relación e interacción con el virus.....	36
8.3 Relación con sistema inmune.....	37
8.4 Persistencia y DVGs.....	37
OBJETIVOS.....	40
MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
1. Material biológico.....	42
1.1 células eucariotas	42

1.2 células procariotas.....	42
1.2.1 Generación de bacterias competentes.....	43
1.2.2 Transformación bacteriana.....	43
1.3 Virus.....	43
2. Reactivos.....	44
2.1 Plásmidos.....	44
2.2 Anticuerpos.....	44
2.3 Cebadores.....	45
2.4 Otros reactivos.....	46
3. Métodos.....	47
3.1 Infecciones virales.....	47
3.2 Titulación de IBDV.....	47
3.3 Transfecciones	47
3.4 Preparación de inóculos de IBDV.....	48
3.5 Extracción y manipulación de ácidos nucleicos.....	48
3.5.1 purificación de RNA.....	48
3.5.2 Purificación de DNA.....	49
3.5.2.1 purificación de DNA plasmídico.....	49
3.5.2.2 purificación de DNA genómico celular.....	49
3.5.3 Reacciones de PCR.....	49
3.5.4 Purificación de productos de PCR.....	49
3.5.5 Retrotranscripción de RNA.....	49
3.6 Análisis bioquímicos.....	50
3.6.1 PCR cuantitativa a tiempo real.....	50
3.6.2 Inmunodetección de proteínas.....	50
3.6.3 Inmunofluorescencia (IF).....	51
3.6.4 Determinación de la viabilidad celular.....	51
3.6.5 Determinación de la actividad a poptótica.....	52
3.7 Análisis estadístico.....	52
3.8 Secuenciación masiva.....	52
3.8.1 Secuenciación del genoma de IBDV.....	52
3.8.2 Análisis de alto rendimiento del genoma celular (High-throuhput sequencing).....	52
3.8.3 Secuenciación de RNA utilizando la tecnología Illumina HiSeq.....	53
3.8.4 Analisis bioinformático se la secuenciación de RNA.....	53

RESULTADOS.....	55
1. Establecimiento de infecciones persistentes por parte de IBDV.....	55
1.1 IBDV es capaz de establecer infecciones persistentes estables en cultivo celular.....	55
1.2 Caracterización de las células DF-1 persistentes.....	56
1.3 Caracterización del virus presente en las células persistentes.....	58
2. Elementos celulares implicadas en el establecimiento de la infección persistente por parte de IBDV.....	60
2.1 Eliminación de IBDV de células DF-1P.....	60
2.2 Las células DF-1PC muestran una tasa de supervivencia a la infección superior a la de la línea DF-1 parental.....	62
2.3 La vía de señalización JAK-STAT está bloqueada funcionalmente en las células DF-1PC.....	64
2.4 Las células DF-1PC expresan una versión no funcional del receptor IFN de tipo 1.....	66
2.5 Las mutaciones en la región C-terminal del gen IFNAR-2 inactivan la ruta de señalización JAK-STAT.....	70
2.6 Efecto de la inactivación de la ruta JAK-STAT sobre la respuesta a interferón por IBDV de células HeLa.....	72
3. Elementos virales influyentes en el establecimiento de infecciones persistentes por parte de IBDV.....	76
3.1 Heterogeneidad fenotípica célula-célula en las infecciones de IBDV en cultivo celular.....	77
3.2 Las células DF-1P presentan susceptibilidad opuesta a ser infectadas por IBDV u otros virus RNA.....	78
3.3 La capacidad replicativa de IBDV es dependiente del input viral inicial.....	81
3.4 Observamos genomas aberrantes y diferencias en la replicación tras realizar un análisis de la secuenciación de RNA (NGS) de células QM7 infectadas con diferente input viral.....	86
DISCUSIÓN.....	91
1. IBDV es capaz de generar infecciones persistentes en cultivo celular.....	91
2. El IBDV persistente no presenta diferencias significativas con respecto al IBDV WT parental.....	92
3. La capacidad de respuesta a interferón es importante para el establecimiento de infecciones persistentes por parte de IBDV.....	94

3.1	Las células DF-1PC y DF-1P expresan una versión truncada del receptor IFNAR-2.....	94
3.2	Las células DF-1PC sufren menos apoptosis y mayor entrada en persistencia que las DF-1 WT.....	95
3.3	La ausencia de la cascada de señalización inducida por la ruta JAK-STAT disminuye la apoptosis y favorece el establecimiento de persistencia en células HeLa.....	96
3.4	¿Qué fue antes la mutación o la persistencia?.....	96
3.5	Cascada de señalización inducida por la infección de IBDV en la naturaleza.....	97
4.	Las infecciones causadas por IBDV en cultivo celular generan DVGs.....	97
4.1	Interferencia de DVGs con el ciclo replicativo de IBDV y relación con el establecimiento de infecciones persistentes.....	99
4.1.1	La variabilidad fenotípica célula-célula dentro de la monocapa infectada por IBDV podría estar relacionada con la acumulación de DVGs.....	99
4.1.2	Un input viral inicial elevado conlleva a una mayor acumulación potencial de DVGs y a la consiguiente enor producción de proteínas virales y virus infectivo.....	100
4.1.3	El equilibrio encontrado entre DVGs y virus infectivo en células persistentes impide la replicación de nuevo IBDV.....	101
4.1.4	DVGs de IBDV y su interacción con las rutas de señalización celulares.....	102
5.	Establecimiento de infecciones persistentes por parte de IBDV.....	102
	CONCLUSIONES.....	106
	BIBLIOGRAFÍA.....	108
	ANEXOS.....	120

Índice de Figuras

Figura 1. Organización genómica de IBDV.....	21
Figura 2. Estructura del virión de IBDV.....	22
Figura 3. Transcripción y replicación del genoma de IBDV.....	26
Figura 4. Esquema representativo de la ruta de señalización de IFN de tipo 1.....	31
Figura 5. Modelo representativo de diferentes tipos de DVGs.....	36
Figura 6. Generación de células infectadas persistentemente por IBDV.....	56
Figura 7. Caracterización de las células DF-1P.....	57
Figura 8. Caracterización de las células DF-1P.....	58
Figura 9. Fitness replicativo del virus de infecciones persistentes.....	59
Figura 10. Eliminación del virus de las células DF-1P.....	61
Figura 11. Comparación de la susceptibilidad y capacidad de supervivencia a una infección por IBDV entre células DF-1 y DF-1PC.....	63
Figura 12. Análisis de la inducción de apoptosis tras la infección por IBDV en células DF-1 y DF-1PC.....	64
Figura 13. Análisis de la capacidad de respuesta a INF- α de células DF-1 y DF-1PC.....	65
Figura 14. Análisis de la expresión de ISGs en células DF-1 y DF-1PC.....	66
Figura 15. Detección de un polimorfismo en un único nucleótido del exón 10 de IFNAR-2.....	68
Figura 16. Esquema de la expresión de la proteína IFNAR-2 truncada.....	71
Figura 17. Recuperación de la expresión de IFNAR-2 en células DF-1PC.....	72
Figura 18. Efecto de la inactivación de la ruta JAK-STAT en células HeLa infectadas por IBDV.....	73
Figura 19. Efecto de la inactivación de la ruta JAK-STAT en células HeLa infectadas por IBDV.....	74
Figura 20. Establecimiento de infecciones persistentes en células HeLa IFNAR-2 KO.....	75
Figura 21. Análisis proteico de la infección por IBDV en células HeLa IFNAR-2 KO.....	76

Figura 22. Heterogeneidad fenotípica célula-célula en células DF-1 y QM7 tras la infección por IBDV.....	77
Figura 23. Infección de diferentes líneas DF-1 con diferentes cepas de IBDV.....	79
Figura 24. Infección de DF-1, DF-1P y DF-1PC con IBDV, Reovirus aviar, VSV-GFP y SFV-GFP.....	80
Figura 25. Análisis de infecciones con diferentes MOIs de IBDV en células QM7.....	82
Figura 26. Análisis de título viral y acumulación de proteínas en infecciones con diferentes MOIs de IBDV en paralelo en células DF-1, DF-1PC y QM7.....	83
Figura 27. Análisis de la expresión viral en infecciones con diferentes MOIs de IBDV en paralelo en células DF-1, DF-1PC y QM7.....	84
Figura 28. Ensayo de IF de infecciones con diferentes MOIs de IBDV en paralelo en células DF-1, DF-1PC y QM7.....	85
Figura 29. Porcentaje de células infectadas en infecciones con diferentes MOIs de IBDV en paralelo en células DF-1, DF-1PC y QM7.....	86
Figura 30. Porcentaje de tipos de DVGs encontrados por secuenciación de RNA en infecciones de IBDV en QM7.....	87
Figura 31. Análisis de las lecturas virales encontradas por secuenciación de RNA en muestras de QM7 infectadas con diferentes MOIs de IBDV.....	88
Figura 32. Porcentaje de lecturas encontradas por secuenciación de RNA de muestras de QM7 infectadas que mapean en el segmento B y segmento A de IBDV.....	88
Figura 33. Modelo del posible mecanismo para la formación de DVGs en IBDV.....	99
Figura 34. Posible modelo del establecimiento de infecciones persistentes por parte de IBDV...	104

Índice de tablas.

Tabla 1. Anticuerpos empleados durante el transcurso de este trabajo.....	44
Tabla 2. Cebadores empleados durante el transcurso de este trabajo.....	46
Tabla 3. Reactivos empleados durante el transcurso de este trabajo.....	46
Tabla 4. SNPs encontrados en los exomas de DF-1PC por secuenciación de DNA.....	66
Tabla 5. SNPs localizados tras la secuenciación de colonias transfectadas con el plásmido pGEM-t Easy al que se le ha incorporado el fragmento de la secuencia que contiene los dos SNPs localizados por secuenciación de DNA de DF-1PC.....	68

ABREVIATURAS

7-DMA: 7-deaza-2'-C-methyladenosina

ADP: Adenosin difosfato

ALV: Virus de la Leukosis Aviar (*Avian leukosis virus*)

ANOVA: Análisis de varianza (*Analysis of variance*)

Anx2: Anexina II

Apaf1: Factor 1 de proteasa activadora de apoptosis (*Apoptosis protease-activating factor-1*)

ATCC: Colección americana de tipos celulares (*American type cell collection*)

ATF-2: Factor 2 de transcripción activador (*Activating transcription factor 2*)

BCL-2: Proteína linfoma 2 de célula B (*B-cell lymphoma 2*)

BSA: Albumina de suero bovino (*Bovine serum albumin*)

C-terminal: Carboxilo terminal

Ca²⁺: Ión de calcio

cDCs: Células dendríticas presentadoras de antígenos convencionales (*conventional dendritic cells*)

cDNA: DNA complementario (*complementary DNA*)

CMV: Citomegalovirus

CO₂: Dióxido de Carbono

CTR: receptores de las células T (*Cell-T receptor*)

cvIBDV: IBDV de virulencia clásica (*classical virulent IBDV*)

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DF-1: células en cultivo originadas mediante transformación espontánea de fibroblastos embrionarios de pollo

DF-1P: células DF1 infectada persistentemente

DF-1PC: células DF1-P curada mediante tratamiento con 7-DMA

DH5alfa: bacterias E.coli competentes

DIP: Partículas defectivas interferentes (*Defective interfering particles*)

DMEM: Medio de cultivo Eagle modificado Dulbecco (*Dulbecco's Eagle modified médium*)

DMSO: Dimetilsulfoxido

DNA: Ácido desoxiribonucleico (*Desoxiribonucleic acid*)

dNTP: Desoxinucleotido trifosfato

dsRNA: RNA de doble cadena (*Doble stranded RNA*)

DTT: Ditioneitol

DVG: Genomas virales defectivos (*Defective viral genomes*)

E. coli: Bacteria de la especie *Escherichia Coli*

ECL: Quemiluminiscencia mejorada (*Enhanced chemiluminescence*)

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)

EE. UU: Estados Unidos de América

eIF2 α : Factor de iniciación eucariota 2 *a* (*Initiation factor 2 a*)

FADD: Proteína asociada a Fas con dominio de muerte (*Fas-associated protein with death domain*)

FBS: Suero Fetal Bovino (*Fetal bovine serum*)

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)

GAS: Secuencia activada por gamma (*Gamma activated sequence*)

GFP: Proteína fluorescente verde (*Green fluorescent protein*)

GTP: Guanosina trifosfato (*Guanosine Triphosphate*)

HeLa: Células en cultivo cuyo origen son células epiteliales de cáncer cervical humano

HPRT: Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1)

IBD: Enfermedad de la bursitis infecciosa (*Infectious bursal disease*)

IBDV: Virus de la bursitis infecciosa (*Infectious bursal disease virus*)

IFN: interferón

IFNAR: Receptor de IFN α y β (*Interferón α/β Receptor*)

IFNGR: Receptor de IFN- γ (*IFN- γ receptor*)

I κ B: Inhibidor del factor nuclear kappa β (*Inhibitor of nuclear factor kappa β*)

IKK- ϵ : Inhibidor de la subunidad épsilon de la quinasa de fracción nuclear Kappa β (*Inhibitor of nuclear fraction kappa β kinase subunit ϵ*)

IPNV: virus de la necrosis pancreática (*Infectious necrotic pancreatic virus*)

IRF-3: Factor 3 de regulación de interferón (*Interferón regulatory factor 3*)

IRF-7: Factor 7 de regulación de interferón (*Interferón regulatory factor 7*)

IRF-9: Factor 9 de regulación de interferón (*Interferón regulatory factor 9*)

ISG: Genes inducibles por interferón (*Interferón-stimulated genes*)

ISGF3: Factor 3 del gen estimulado por interferón (*IFN-stimulated gene factor 3*)

ISRE: Elementos estimulados por respuesta a IFN (*IFN-stimulated response elements*)

JAK: Quinasas Janus (*Janus Kinases*)

Kb: Kilobase (1000 pares de bases)

KDa: Kilodalton

LCMV: Virus de la Coreomeningitis Linfocítica (*The virus of lymphocytic choriomeningitis*)

LGP2: Proteína del laboratorio de genética y fisiología 2 (*Laboratory of genetics and physiology 2*)

MDA5: Gen 5 asociado a la diferenciación de melanoma (*Melanoma Differentiation-Associated gene 5*)

MeV: Virus de la esclerosis de Mink (*Mink esclerosis virus*)

miRNA: micro RNA

MOI: Multiplicidad de infección (*Multiplicity of infection*)

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltil tiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*)

MW: Peso molecular (*Molecular weight*)

Mx: proteína de unión a GFP Mx1 inducida por interferón (*Interferon-induced GTP-binding protein Mx1*)

N-terminal: Amino terminal

NEMO: Modulador esencial de NF-κB. (*NF-κB essential modulator*)

Nfκb: Factor nuclear Kappa beta (*Nuclear factor Kappa beta*)

NGS: Secuenciación de nueva generación (*New Generation Sequencing*)

NK: Células natural killer

OAS: 2'-5' oligoadenylato sintetasa (*2'-5' oligoadenylate synthetase*)

OIE: Organización mundial de sanidad animal

ORF: Marco abierto de lectura (*Open Reading Frame*)

P.i.: Post infección

P100: Placa de 100 nm de diámetro

PACT: Proteína activadora de PKR (*PKR activating protein*)

PARP-P: proteína PARP escindida

PARP: Poli ADP ribosa polimerasa (*Poly (ADP-ribose) Polymerases*)

Pb: Par de bases

PBS: Tampón fosfato salino (*Phosphate-Buffered Saline*)

PCR: Reacción de la polimerasa en cadena (*Polymerase Chain Reaction*)

PFA: Paraformaldehido

UFP: Unidades formadoras de placas de lisis

pIFNβ-luc: Plásmido pIF(-116/+72) lucifer

PIP: Fosfoinositido (*phosphatidylinositol phosphate*)

PIPES: Piperazine-N 'N-bis (2-ácido etanosulfónico) (*piperazine-N 'N-bis (2-ethanesulfonic acis)*)

PKR: Proteína quinasa R (*Protein Kinase R*)

PRR: Receptores de reconocimiento de patrones (*Pattern Recognition Receptors*)

pVP2: Precursor de la proteína VP2 de IBDV

QM7: Línea celular originada a partir de monocitos de codorniz.

qPCR: PCR cuantitativa (*quantitative PCR*)

RdRp: Polimerasa de RNA dependiente de RNA (*RNA dependent RNA polymerase*)

RIG-I: Gen I inducible por ácido retinoico (*Retinoic acid-Inducible Gen I*)

RIN: Número de integridad del RNA (*RNA Integrity Number*)

RLR: Receptores tipo RIG-I (*RIG-I Like Receptors*)

RNA: Ácido ribonucleico (*Ribonucleic acid*)

RNasa: Ribonucleasa

RNasaL: Ribonucleasa L

RNP: Complejos ribonucleoproteicos (*Ribonucleoprotein*)

RT-PCR: Retrotranscripción y PCR

RT-qPCR: Retrotranscripción y qPCR

SDS-PAGE: Electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (*SDS-polyacrilamide gel electrophoresis*)

SDS: Dodecil sulfato sódico (*Sodium dodecil sulfate*)

siGM: Inmunoglobulina M de superficie

SNPs: Substitución puntual de nucleótidos (*Substitution of nucleotide position*)

STAT: Transductor de señal y activador de transcripción (*Signal transducer and activator of transcription*)

TA: Temperatura ambiente

TANK: Activador de NF- κ B asociado a la familia TRAF (*TRAF family member-associated NF-kappa-B activator*)

TBE: Tampón Tris-Borato-EDTA

TBK-1: Quinasa 1 de unión a TANK (*TANK-Binding Kinase I*)

TBS: Tampón Tris salino (*Tris-Buffered Saline*)

TCID50: Dosis infectiva 50% (*Fifty-percent tissue culture infective dose*)

TLR: Receptor Toll-Like (*Toll-Like Receptor*)

TNF: Factor de necrosis tumoral (*Tumor necrosis factor*)

TNFR: Receptor de factores de necrosis tumoral (*Tumor necrosis factor receptor*)

TRAF3: Factor asociado a TNFR 3 (*TNFR associated factor 3*)

TYK: Tyrosina quinasa (*Tyrosin kinase*)

U: Unidades

UFP: Unidades formadoras de pocillo

UTR: Región no traducida (*Untranslated region*)

UV: Ultravioleta

VPg: Proteína viral unida al genoma (*Viral Protein genome-linked*)

VSV: Virus de la estomatitis vesículas (*Vesicular Stomatitis Virus*)

wIBDV: IBDV muy virulento (*very virulen IBDV*)

WB: Western Blot

WT: Tipo salvaje (*Wild Type*)

INTRODUCCIÓN

1. Taxonomía.

EL virus de la bursitis infecciosa (*Infectious Bursal Disease Virus*; IBDV) es el agente etiológico de una enfermedad inmunosupresora aguda y altamente contagiosa que afecta de forma exclusiva a formas juveniles de pollo doméstico (*Gallus Gallus*) denominada bursitis infecciosa (IBD) o enfermedad de Gumboro, en referencia a la localidad (Gumboro, Delaware, EE.UU.) donde en 1957 se detectó el primer brote de la enfermedad¹.

IBDV, único representante del género *Abivirnavirus*, es el miembro mejor caracterizado de la familia *Birnaviridae* formada por cuatro géneros: i) *Aquavirnavirus* que infectan diferentes animales de vida acuática incluyendo peces, moluscos y crustáceo; ii) *Avibirnavirus* que infectan aves y cuya única especie conocida es IBDV; iii) *Blosnavirus* cuya única especie conocida infecta peces cabeza de serpiente (*Channa maculata*); y iv) *Entomobirnavirus* que infectan diferentes especies de insecto².

2. Estructura genómica de IBDV.

Los birnavirus son virus icosaédricos desnudos que poseen un genoma bi-segmentado formado por RNA bicatenario (dsRNA) por lo que se incluyen en el grupo III de la clasificación de Baltimore². El genoma de IBDV está constituido por dos segmentos de dsRNA de 3,2 (segmento A) y 2,8 (segmento B) kb, respectivamente.

El segmento B contiene una única fase de lectura abierta (ORF) que codifica una proteína multifuncional de 97 kDa denominada VP1. VP1 que actúa como polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRp), como proteína cebadora (*primer*) durante el inicio de los procesos de transcripción y replicación del genoma viral, y como VPg (viral protein genome-linked) permaneciendo unida al extremo 5' de ambas hebras de los dsRNA virales^{3,4}.

El segmento A posee dos ORF parcialmente solapadas. La primera de ellas codifica una proteína no estructural denominada VP5 de 17 kDa. Esta proteína es dispensable para la replicación viral in vitro pero juega un papel central tanto en la diseminación célula-célula de la progenie viral^{5,6} como en la virulencia del virus en pollos infectados experimentalmente⁷. El segundo ORF codifica una poliproteína de 110 kDa que sufre un auto-procesamiento proteolítico que libera tres polipéptidos denominados pVP2, VP3 y VP4, respectivamente⁸. El procesamiento es mediado por VP4 (27 kDa), un dominio con actividad proteasa localizado en la región central de la poliproteína. Esta es una proteasa no canónica que utiliza una diana catalítica serina-lisina que actúa sobre dipéptidos de alanina localizados en regiones desestructuradas de la poliproteína⁹⁻¹¹.

La proteína pVP2 (54,4 kDa) es la precursora de la proteína de la cápsida. pVP2 sufre un procesamiento auto-proteolítico que elimina una región de 71 residuos de su extremo C-terminal dando lugar a la forma madura de la proteína denominada VP2 (441 residuos; 42 kDa). Como se describe más adelante, el procesamiento de pVP2 es esencial para la maduración de la partícula viral ¹².

Por su parte, VP3 (29 kDa) es una proteína homodimérica y multifuncional que actúa como: i) elemento de andamiaje durante la morfogénesis de la partícula viral¹³; ii) proteína de unión a dsRNA, una actividad esencial para el ensamblaje de los complejos ribonucleoproteicos (RNP) que se describirán más adelante, así como para la estrategia de evasión empleada por IBDV para contrarrestar la respuesta innata antiviral inducida por la acumulación de dsRNA viral ¹⁴⁻¹⁶; y iii) activador de la RdRp (VP1) provocando un cambio conformacional en VP1 que facilita el desbloqueo de su centro activo^{17,18}.

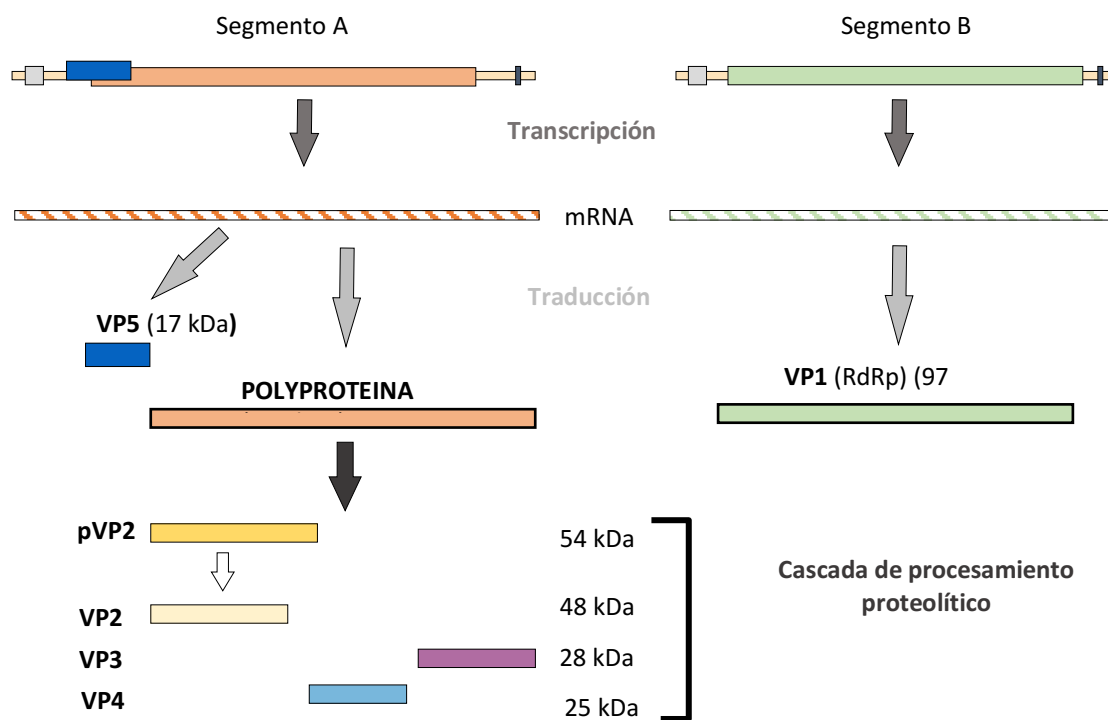


Figura 1. Organización genómica de IBDV. El segmento A contiene dos marcos de lectura abierta (ORF), el primero de ellos codifica para la proteína viral no estructural VP5 y el segundo para la poliproteína. La poliproteína sufre un proceso de autoproteolítico que libera las pVP2, VP3 y VP4. La proteína pVP2 sufre un procesamiento proteolítico que da lugar a VP2, forma madura de la proteína de la capsida. El segmento B contiene un único marco de lectura abierta que codifica la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) viral denominada VP1.

3. Estructura de la partícula viral.

Los viriones de IBDV carecen de envuelta lipídica y están formados por una única cápsida icosaédrica (65-70 nm de diámetro) que presenta una simetría T=13. La cápsida está constituida por 260 trímeros de la proteína VP2 organizados en 12 pentámeros y 120 hexámeros^{19,20}. El interior de la partícula está ocupado por complejos RNPs formados por los segmentos genómicos asociados a las proteínas VP1 y VP3. En ellos, la proteína VP1 se encuentra tanto en forma “libre”, interaccionando de forma no covalente con la proteína VP3, como en su forma VPg, unida covalentemente al genoma. Por su parte, la proteína VP3 interacciona a través de interacciones electrostáticas con el dsRNA, recubriendo ambos segmentos genómicos⁴. Estudios realizados en nuestro laboratorio indican que la encapsidación de los RNPs tiene lugar de forma aleatoria sin orden de prelación en la incorporación de los segmentos²¹.

La replicación de IBDV da lugar a la producción de una progenie viral heteroploide que incluye la presencia de una baja proporción de partículas vacías, carentes de RNPs y por tanto de genoma, así como la de viriones que albergan desde uno hasta cuatro segmentos genómicos. Sin embargo, la inmensa mayoría (aprox. 96%) de la progenie viral infectiva corresponde a viriones poliploides que contienen 4 segmentos genómicos²¹. Esta heteroploidía es un fenómeno único entre los virus icosaédricos estudiados hasta la fecha. La observación más reciente de la existencia de heteroploidía en la progenie de IPNV, un virus perteneciente al género *Aquabirnavirus*, sugiere que éste es un rasgo común entre los miembros de la familia *Birnaviridae*²²

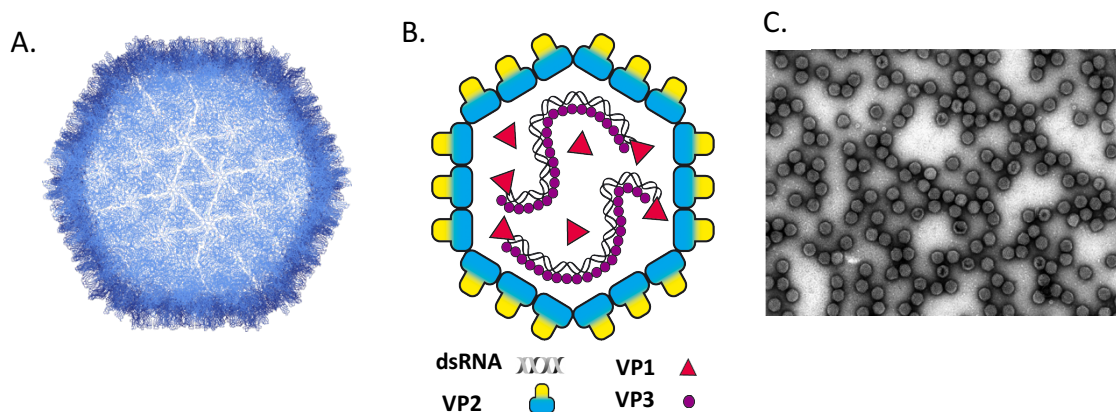


Figura 2. Estructura del virión de IBDV. **A.** Diagrama de cintas correspondiente a la superficie de cápsida viral constituida por 260 trimeros de la proteína VP2. **B.** Representación gráfica que muestra un modelo de la estructura del virion y sus componentes, indicando la topología de las proteínas estructurales (VP1, VP2 y VP3) y los segmentos genómicos. Aunque en la figura se muestran dos segmentos, la mayoría de viriones infectivos contienen cuatro segmentos. Los complejos RNP formados por la asociación de las proteínas VP1 y VP3 al dsRNA genómico ocupan el espacio interior de la cápsida. **C.** La micrografía de viriones corresponde a partículas purificadas de IBDV.

4. Tropismo, patogenicidad y vacunas.

Aunque los brotes iniciales de IBD se localizaron en una región muy reducida del estado de Delaware (EE. UU), durante los últimos 40 años del siglo 20 la enfermedad tuvo una dispersión extraordinariamente rápida y actualmente presenta una distribución global, lo que constituye una amenaza severa para la industria avícola mundial. La repercusión socioeconómica de la IBD ha llevado a incluirla en la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE; <https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2020/>).

A pesar de que se ha detectado la presencia de anticuerpos específicos frente a IBDV y aislado virus infectivo en individuos pertenecientes a una gran variedad de especies aviares, tanto domésticas como silvestres, solo se ha documentado la inducción de patogenicidad en pollos de gallina doméstica. Por otra parte, y a pesar de que la detección de anticuerpos contra IBDV en análisis de sueros de aves salvajes parece indicar una posible implicación en la transmisión del virus, hasta el momento no se ha documentado la existencia de una o más especies que puedan actuar como reservorio del virus ^{23,24}.

Se han identificado dos serotipos de IBDV. El serotipo 1 agrupa a todos los aislados virales patogénicos, mientras que las cepas pertenecientes al serotipo 2, fundamentalmente detectadas en muestras de pavo doméstico (*Meleagris gallopavo*) y algunas aves acuáticas, son completamente apatogénicas ²⁵.

La patogenicidad del virus se evalúa mediante la realización de infecciones experimentales en pollos domésticos libres de patógenos (*specific pathogen free*; SPF). Es muy importante resaltar la existencia de una gran variabilidad en la patogenicidad de las cepas pertenecientes al serotipo 1. Las cepas virales aisladas hasta el año 1987, denominadas genéricamente “virulentas clásicas” (cvIBDV) presentan una virulencia moderada, con tasas de mortandad inferiores al 20%. Sin embargo, a partir de ese año tuvo lugar un drástico incremento en la virulencia de los brotes de IBD. Estos brotes, provocados por cepas conocidas como “muy virulentas” (vvIBDV) provocan

tasas de mortandad superiores al 70%, se hicieron, y continúan siendo, prevalentes a nivel mundial ²⁶⁻²⁹.

El periodo de incubación de IBDV es corto, de 2-3 días en el caso de cvIBDV e inferior a 60 h en infecciones con vvIBDV. En las infecciones con vvIBDV, los pollos sufren de deshidratación, diarrea, pérdida de plumaje y laxitud. Todo lo anterior, se acompaña de tasas de mortalidad muy elevadas que alcanza su máximo a los 3-4 días tras la aparición de los primeros síntomas. La mayoría de los individuos que sobreviven los primeros 7 días de la infección, se recuperan, aunque sufren una inmunodeficiencia severa que revierte de forma gradual. Una proporción elevada de los animales supervivientes permanecen infectados de forma persistente pudiendo actuar como portadores inaparentes de IBDV ²³.

El virus presenta un fuerte tropismo por células B inmaduras localizadas en la bolsa de Fabricio, aunque también se ha observado su replicación en macrófagos y monocitos ³⁰. La máxima susceptibilidad a la infección se alcanza en pollos de entre 3 y 8 semanas de edad periodo coincidente con el máximo desarrollo de la bolsa de Fabricio, el órgano linfoide primario esencial para el desarrollo inmunológico de las aves ^{23,31}. En individuos jóvenes la infección provoca una eliminación masiva de pre-linfocitos B así como la destrucción concomitante de la bolsa de Fabricio y la afección de otros órganos linfáticos secundarios ^{28,32,33}. La eliminación de las poblaciones de linfocitos B conduce al establecimiento de una inmunosupresión severa que retrasa la maduración inmunológica y facilita la aparición de infecciones secundarias por patógenos oportunistas que, en muchos casos, provoca la muerte del animal infectado ^{34,35}.

La única forma de transmisión documentada de forma fehaciente es la trasmisión horizontal que tiene lugar por vía fecal-oral. Las heces de los animales infectados están cargadas de virus infectivo³⁴. Las partículas de IBDV son extraordinariamente resistentes a las condiciones medioambientales habiéndose detectado infectividad en material contaminado con IBDV durante al menos cuatro meses. La capacidad de resistencia de IBDV también es muy efectiva frente a los agentes de desinfección habitualmente empleados en las explotaciones avícolas ²³.

El único método efectivo para el control de la enfermedad se basa en la implementación de programas de vacunación intensivos que implican la vacunación tanto de las madres como de los pollos ³⁴. La inmunización en tiempos tempranos es muy importante para evitar la inmunosupresión causada por IBDV.

Las gallinas madres se inmunizan con vacunas que contienen virus inactivado formuladas con adyuvantes. De esta forma, a través del saco vitelino, la descendencia recibe anticuerpos

neutralizantes frente a IBDV. El nivel de anticuerpos maternos decae en un periodo de 3-5 semanas. En ese momento es necesario inmunizar a los pollos.

Actualmente las vacunas con virus vivo atenuado son las más utilizadas. Estas vacunas, que mimetizan el proceso de infección natural, desencadenan un potente respuesta inmune humoral y celular ³⁶. Sin embargo, y a pesar de que estas vacunas son efectivas para la mayoría de las infecciones por cvIBDV, no son muy eficientes contra algunas nuevas variantes antigénicas emergentes de vvIBDV ^{37,38}. En la actualidad se están desarrollando vacunas mediante la técnica de genética reversa que podrían solucionar algunos de estos problemas ³⁹. Por su parte, las vacunas basadas en inmuno-complejos son de gran importancia. Estas vacunas están formadas por una mezcla de virus vivo y anticuerpos contra IBDV procedentes de pollos hiper-inmunizados o anticuerpos recombinantes neutralizantes. En general estas vacunas generadoras una potente respuesta inmune. Las vacunas de inmuno-complejos pueden ser administradas tanto *in ovo* como en pollos recién nacidos (1 día de edad) y ser funcionales a pesar de la presencia de anticuerpos maternos ⁴⁰

5. Ciclo de replicación.

El ciclo se inicia con la interacción de las partículas de IBDV a su receptor(es) específico en la membrana celular. Hasta el momento se han descrito cuatro posibles receptores para el virus: i) la inmunoglobulina M de superficie ⁴¹, ii) la proteína de choque calórico 90⁴²; iii) la integrina $\alpha 4\beta 1$ ⁴³; y iv) la anexina II⁴⁴.

La interacción con el receptor provoca un proceso de macropinocitosis de la partícula viral por parte de la célula⁴⁵. La macropinocitosis consiste en la formación de endosomas que introducen las partículas virales en el citoplasma celular. En el interior del endosoma se produce una drástica disminución tanto del pH como de la concentración de iones Ca^{2+} que provoca una rápida desestabilización de la cápsida viral que facilita la liberación de tres péptidos anfipáticos asociados a la partícula, generado durante el procesamiento auto-proteolítico del extremo C-terminal de la proteína pVP2. El mejor caracterizado de ellos es el péptido denominado pep46. Este es capaz de provocar poros y eventualmente lisar la membrana del endosoma lo que conduce a la liberación del genoma en forma de RNPs⁴⁶. Estas son responsables del inicio del proceso de transcripción y replicación del genoma viral⁴⁷. Tanto replicación de genoma como el ensamblaje de la progenie parecen producirse en asociación con membranas de diferentes compartimentos citoplasmáticos.⁴⁸

La liberación de la progenie tiene lugar en dos fases y empleando dos mecanismos independientes. Durante la fase exponencial de replicación del virus, las partículas son liberadas mediante un mecanismo no lítico dependiente de la proteína no estructural VP5. Este mecanismo facilita una rápida diseminación célula-célula y parece ser esencial para la virulencia del virus⁴⁹. El segundo mecanismo está directamente asociado a la lisis de las células infectadas que se produce al final de la infección. Este mecanismo tardío provoca la salida al medio extracelular tanto de partículas virales individuales como de agregados paracrystalinos formados por cientos o miles de viriones formando estructuras muy ordenadas y compactas que podrían explicar la enorme capacidad de persistencia del virus en el medio ambiente.

5.1 Transcripción y Replicación del genoma de IBDV.

La transcripción y replicación del genoma de IBDV es dependiente de la presencia de las altamente conservadas regiones no traducidas (UTR, *Untranslated Regions*) en los extremos 3' y 5' de los segmentos del dsRNA⁵⁰. La transcripción del genoma sigue un mecanismo semi-conservativo que libera una hebra codificante parental de la hebra de dsRNA. Esta hebra +ssRNA puede ser utilizada como molde para nueva replicación o como mRNA para la síntesis de los polipéptidos virales (figura 3).

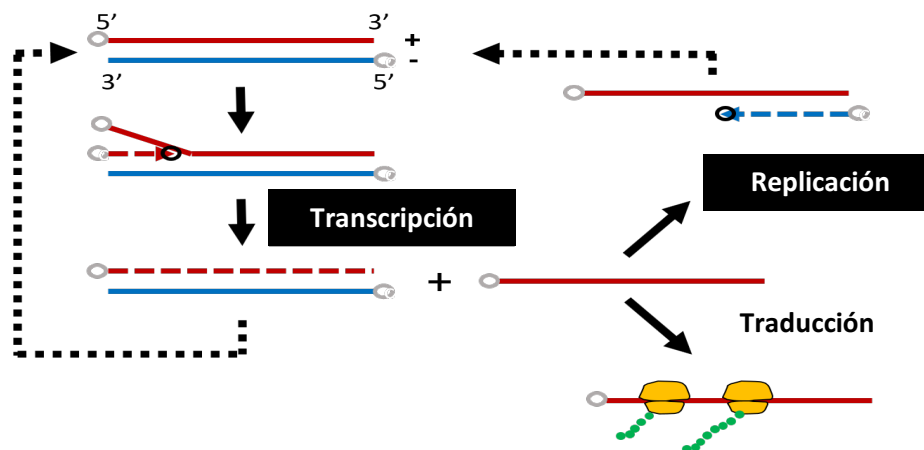


Figura 3. Transcripción y replicación del genoma de IBDV. Los dsRNA genómicos se transcriben siguiendo un modelo semi-conservativo dependiente de cebadores. La polimerasa viral VP1 actúa de ambas formas: como cebador (círculo gris), para facilitar la transcripción, y como RdRp (círculo negro). La molécula de VP1 interactúa con el extremo 3' de los segmentos de polaridad negativa (-), aportando el cebador para la iniciación de la transcripción llevando a la síntesis de una nueva hebra de RNA positiva (+). La transcripción de RNA libera una vieja hebra (+ssRNA) y a su vez da lugar a la formación de un nuevo segmento dsRNA. La hebra +ssRNA liberada es utilizada bien como mRNA para la síntesis de proteínas virales, o bien, como molde para la replicación de RNA. Las moléculas de VP1 que actúan como cebadores para la transcripción y replicación son VPgs que permanecen covalentemente unidas al extremo 5' de los +ssRNA de ambas hebras del dsRNA.

6. IBDV y sistema inmune.

Como la mayoría de los agentes patógenos, IBDV activa la respuesta inmune en el hospedador. Esta respuesta implica, entre otros mecanismos de protección celular, la activación de las rutas de señalización inducidas por interferón (IFN) y la inducción de apoptosis. El virus, a su vez, ha desarrollado mecanismos de evasión y utilización del sistema inmune a su favor. Por una parte, la respuesta inmune influye en la eliminación de IBDV del hospedador, pero por otra, el virus ha sido capaz de adaptarse a los mecanismos celulares y la respuesta inmune innata pudiendo llegar a aprovecharse de estos.⁵¹

6.1 Apoptosis

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada que se desencadena en respuesta a determinados estímulos⁵². Está implicada en diferentes procesos celulares como: desarrollo, proliferación, diferenciación o eliminación de células con algún tipo de daño genético (como pueden ser las células cancerosas)⁵³. Asimismo, la apoptosis se produce en procesos de defensa frente a patógenos, como puede ser una infección viral, evitando de esta manera la propagación del virus⁵².

Las células apoptóticas sufren alternaciones morfológicas, como contracciones y deformaciones, que las separa de las células vecinas y evaginaciones de la membrana plasmática. Tras la deformación de la membrana plasmática se produce una condensación de la cromatina y la formación de los cuerpos apoptóticos. Estas estructuras membranosas formadas por citosol, organelas y fragmentos nucleares son normalmente fagocitadas para evitar una respuesta inmune inflamatoria exacerbada.⁵⁴

6.1.2 Apoptosis e infecciones por IBDV

En infecciones por IBDV la apoptosis es la responsable fundamental de la depleción masiva de linfocitos de la bolsa de Fabricio, que conduce a la inmunosupresión de los pollos infectados^{55,56}. La inducción de apoptosis se ha caracterizado tanto *in vivo* en diferentes tipos celulares de pollos o en embriones infectados⁵⁶⁻⁵⁹, como en infecciones realizadas *ex vivo* tanto en linfocitos periféricos como en líneas celulares como fibroblastos embrionarios de pollo o células Vero⁵⁵.

La inmunidad innata y la consiguiente inducción de apoptosis desempeñan un papel fundamental en la patogenia inducida por IBDV coadyuvando por un lado a la génesis de la tormenta de interleuquinas de consecuencias fatales para el animal infectado²³ así como facilitando la liberación de la progenie viral en la fase final del ciclo de replicación del virus.

En nuestro laboratorio se ha descrito la importancia del IFN, y de su cascada de señalización, en la apoptosis causada con IBDV. Dependiendo del momento de tratamiento de células en cultivo con IFN, el desarrollo de la infección es extremadamente diferente. Tratamientos previos a la infección con esta citoquina inducen una protección total frente al virus, mientras que tratamientos posteriores a la infección provocan una respuesta apoptótica exacerbada. Los altos niveles de IFN producidos durante la infección favorecen la apoptosis⁶⁰. Se ha descrito que en sueros procedentes de animales infectados con cepas vvIBDV se detectan mayores cantidades de IFN en comparación con sueros procedentes de animales infectados con cvIBDV⁵¹. Relacionando este hallazgo con nuestros resultados anteriores, se puede sugerir que las cepas más virulentas de IBDV tienen una mayor capacidad de inducción de la expresión de IFN y consiguientemente de activación de rutas de señalización pro-apoptóticas.

6.2 Interferón e inmunidad innata.

La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra los patógenos y se considera esencial tanto para prevenir infecciones como para mantener la homeostasis celular. La inmunidad innata es la encargada, mediante diferentes mecanismos celulares, de desarrollar e inducir una respuesta contra infecciones tempranas de un agente patógeno⁶¹.

La inmunidad mediada por IFN es parte de la inmunidad innata y representa una primera barrera contra posibles agentes patógenos⁶². Las moléculas de IFN son polipéptidos que fueron descritos por primera vez en células de pollo en 1957. En respuesta a un estímulo externo, como puede ser una infección viral, las células sintetizan IFN, que una vez secretado al medio extracelular interacciona con los receptores específicos presentes, bien en células adyacentes a la célula infectada (vía paracrina), o bien, en la propia célula infectada (vía autocrina). El IFN también puede participar en mecanismos de crecimiento celular, regulación genética, diferenciación y apoptosis. Dentro de la familia del IFN encontramos tres grupos: i) IFN de tipo I, que está constituido por IFN- α e IFN- β , expresados por la mayoría de las células y responsables de la respuesta antiviral; ii) IFN de tipo II, siendo IFN- γ , único representante de este grupo, expresado únicamente por células *natural killer* (NK) y linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺⁶²; y iii) IFN de tipo III que incluye IFN- λ 1, IFN- λ 2 e IFN- λ 3, que tienen función antiviral al igual que los de tipo I, pero su actividad se reduce a células epiteliales debido a la exclusividad de expresión de su receptor⁶³. Para que se desencadene la síntesis de IFN tiene que darse un reconocimiento de los patógenos, el cual está mediado por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR). En la célula encontramos dos grandes grupos de estos receptores, por un lado se encuentran los receptores de membrana Toll-like (TLR), que están asociados tanto a la membrana plasmática

como a compartimentos intracelulares, y por otro receptores citoplasmáticos denominados *retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) like receptors (RLR)* ⁶⁴.

6.2.1 Receptores de reconocimiento de patrones (PRR).

Los receptores TLR están implicados en el reconocimiento de ácidos nucleicos de origen viral. Están formados por un dominio extracelular que presenta repeticiones ricas en leucina capaz de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), un dominio transmembrana y un dominio intracelular por el cual se produce la interacción con otros dominios de moléculas adaptadores como el *TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β* (TRIF) o el factor de 88 de diferenciación mielóide (MyD88), los cuales desencadenan una transducción de señal que activa factores de transcripción como el *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B), los factores reguladores de IFN IFN 3/7 (IRF-3, IRF-7), y el factor 2 de activación de la transcripción (ATF-2). Estos factores son los encargados de iniciar la respuesta antiviral mediante la producción de IFN y citoquinas pro-inflamatorias ⁶⁵.

La familia de los sensores citoplasmáticos RLR está formada por tres miembros principales: RIG-I, *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5) y *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2)⁶⁶. La activación de estos sensores citoplasmáticos desencadena su interacción con la molécula adaptadora mitocondrial proteína de señalización antiviral mitocondrial (MAVS). Esta interacción desemboca en el reclutamiento de las proteínas adaptadores *TNFR-associated factor 3* (TRAF3) y *NF- κ B essential modulator* (NEMO), las cuales conectan y regulan la ruta a través de las quinasas *TANK-binding kinase 1* (TBK-1) e *inhibitor of nuclear fraction kappa B kinase subunit epsilon* (IKK- ϵ). Estas dos quinasas fosforilan los factores de transcripción IRF3 e IRF7, los cuales dimerizan y se translocan al núcleo, donde se asocian con otros factores de transcripción entre los que se encuentra NF- κ B y ATF-2, llevando a la activación de la región promotora de IFN de tipo I, que da lugar a la inducción de su expresión⁶⁷.

El genoma de gallina doméstica carece del gen RIG-I, siendo MDA5 el principal sensor citoplasmático que compensa la ausencia de RIG-I ⁶⁸

6.2.2 Ruta Janus kinase–signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT).

Las rutas JAK-STAT transmiten estímulos procedentes de señales polipeptídicas extracelulares a través de receptores de membrana. Estos receptores tienen la capacidad de desencadenar una cascada de señalización que desemboca en la activación la expresión de numerosas proteínas implicadas en la respuesta inmune innata frente a patógenos sin necesidad de proteínas intermediarias ⁶⁹. Se han descrito cuatro moléculas JAK y siete STAT, lo cual muestran la gran

diversidad de estímulos a los que pueden reaccionar estas rutas⁷⁰. Los tres subgrupos dentro de la familia del IFN son capaces de activar rutas de señalización JAK-STAT.

El IFN de tipo I (IFN- α/β) producido tras el reconocimiento de patógenos virales por los PRR, se une al receptor formado por los receptores 1 y 2 de IFN α/β (IFNAR-1 e IFNAR-2). La unión de IFN produce la dimerización del receptor y el reclutamiento de proteínas tirosina quinasas JAK1 Janus quinasa (JAK1) y Tirosina quinasa 2 (TYK2). JAK1 y TYK2 fosforilan y activan a los factores de transducción de señal y activadores de la transcripción STAT1 y STAT2, formando estos últimos heterodímeros que al unirse a la proteína IRF9 forman un complejo denominado *IFN stimulated gene factor 3* (ISGF3). Este complejo se transloca al núcleo donde se une a la región promotora de genes inducibles por IFN (ISG), a través de motivos de unión a DNA denominados *IFN stimulated response elements* (ISRE) activando su transcripción⁶².

El IFN de tipo II, IFN- γ , también activa una ruta JAK-STAT, aunque con un receptor diferente denominado *IFN- γ receptor* (IFNGR1 y IFNGR2). De la misma manera que en el caso de IFN de tipo I, la unión al receptor provoca la activación de las proteínas JAKs 1 y 2, lo que da lugar a la fosforilación de STAT1 que forma un homodímero que se transloca al núcleo donde se une a la región promotora de los genes activados por IFN- γ (*gamma activated sequence*, GAS)⁶².

En el caso de IBDV el número de ISG estimuladas por el IFN de tipo I es muy elevado, y desencadena un amplio espectro de actividades antivirales. Algunas de las ISGs más destacadas son la proteína quinasa R (PKR), la 2'-5' oligoadenilato sintetasa (OAS), la GTPasa Mx y el receptor MDA-5 descrito anteriormente.

PKR es una serina-treonina quinasa localizada forma latente en el citoplasma de un gran número de líneas celulares. Esta proteína interacciona con moléculas de dsRNA a través de su extremo N-terminal. Esta interacción modifica su conformación y dispara su activación por autofosforilación. También puede ser activada a través del activador proteico PACT (PKR activating protein)⁷¹. La proteína PKR activada provoca la fosforilación de la subunidad α del factor eucariótico de iniciación de la traducción, eIF2 α , y del inhibidor de NF- κ B, I κ B. La fosforilación de F2 α provoca una fuerte inhibición de la iniciación de la traducción dependiente de CAP de RNAs mensajeros. (mRNAs) Por otra parte, la fosforilación de eIF2 α y NF- κ B dispara la activación de diferentes señales pro-apoptóticas⁵². Además, PKR también está relacionada con la apoptosis por las rutas FADD/caspasa 8 y Apaf1/caspasa 9^{72,73}.

La proteína OAS por su parte provoca la síntesis de los oligoadenilatos 2'-5' que inducen la dimerización de la ribonucleasa L (RNAsL), responsable la degradación de ssRNA (incluyendo

mRNAs celulares y virales y RNA ribosomal). Por tanto, la RNasaL activada tiene una función antiviral específica, ya que causa una reducción de la síntesis de proteínas e induce apoptosis ⁷⁴.

La proteína Mx es una GTPasa que interacciona por su región C-terminal y central con complejos virales, produciendo la inhibición de la replicación viral ⁷⁵.

Por último, MDA5 es un receptor citoplasmático que reconoce moléculas de dsRNA de gran tamaño y de ssRNA. El MDA-5 de pollo es capaz de reconocer dsRNA de pequeño y gran tamaño además de ssRNAs. Una vez activado, MDA-5 induce la producción de IFN de tipo I ⁶⁸.

La ruta de señalización mediada por (de) IFN se encuentra representada en la **figura 4**.

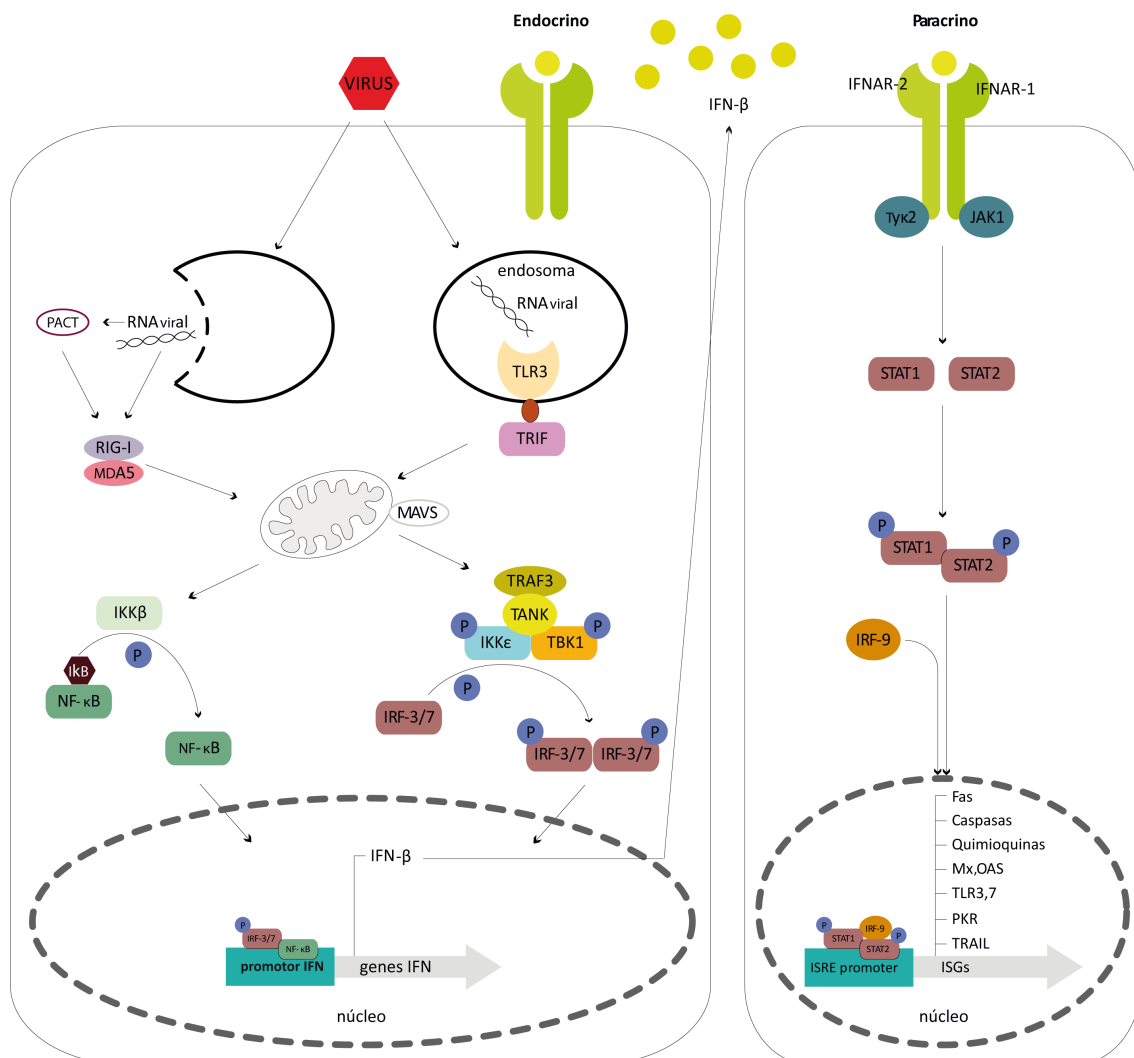


Figura 4. Esquema representativo de la ruta de señalización de IFN de tipo I. El dsRNA viral es reconocido por los receptores citoplasmáticos de la familia RLR como RIG-I y MDA5 o por receptores de la familia. Ambas vías provocan la activación de factores transcripcionales como IRF3/7 y NF- κ B, que, tras su translocación al núcleo, se unen a la región promotora del gen del IFN induciendo su expresión. El IFN secretado se une a su receptor, formado por las proteínas IFNAR-1 e IFNAR-2, activando la ruta JAK/STAT que desencadena la expresión de ISGs implicadas en la respuesta antiviral en apoptosis.

6.3 Interacción de IBDV con la respuesta inmune innata.

Una vez iniciada la infección por IBDV los sensores celulares son capaces de reconocer el dsRNA viral. Si esto ocurre en el propio endosoma de entrada, el sensor encargado es TLR3 y si esto ocurre en el citoplasma celular es MDA-5 el que actúa⁷⁶⁻⁷⁸. Tras el reconocimiento del dsRNA por MDA-5 se produce la activación de una cascada de señalización que dispara la expresión de genes reguladores de la respuesta inmune innata, como PKR, IFN- β o IRF3. Estos sensores activan cascadas de señalización que acaban dando lugar a muerte celular programada⁷⁶. La proteína viral VP3, por su parte, compite con MDA-5 en la unión al dsRNA, VP3 se une al dsRNA y bloquea la vía de señalización capitaneada por MDA-5¹⁶. La expresión de la proteína viral VP2 de manera aislada en células de mamífero y aviares provoca la activación de PKR y la consiguiente activación de rutas pro-apoptóticas. Sin embargo, al expresar la proteína junto a VP3 se revierte la inducción de muerte celular causada por VP2¹⁴. La proteína viral VP5 es capaz de interferir con procesos anti-apoptóticos, retrasando de esta manera la muerte celular y favoreciendo la replicación viral⁷⁹. A su vez, las proteínas VP5 y VP2 han sido relacionadas con inducción de apoptosis durante la fase final del ciclo replicativo del virus lo que podría facilitar la diseminación final del virus^{80,81}.

Es importante resaltar la existencia de contradicciones significativas en los datos experimentales y conclusiones aportados algunos de los estudios mencionados. Por ello, la caracterización de la interacción de IBDV con la respuesta antiviral innata dista mucho de ser un capítulo cerrado.

7. Infecciones Persistentes.

7.1 Infecciones persistentes en Birnavirus.

Las infecciones más habituales dentro del amplio espectro de tipos virales son las infecciones agudas. En ellas, el virus replica y es capaz de diseminarse antes de su eliminación por el sistema inmune y/o muera el hospedador. Sin embargo, en ciertas ocasiones, algunos virus líticos son capaces de establecer infecciones persistentes. En ellas, los virus consiguen, mediante complejos mecanismos de interacción con la maquinaria celular, alcanzar un equilibrio que permite su

mantenimiento sin causar la muerte de la célula huésped. Este equilibrio puede alcanzarse por diferentes vías: i) no replicativa, el virus permanece en estado de latencia ^{82,83} integrando su genoma en el genoma celular; y ii) replicativa, en la que el virus sigue utilizando la maquinaria celular para replicar ^{84,85}.

En la familia *Birnaviridae* se han descrito virus capaces de producir infecciones agudas que desembocan en el establecimiento de infecciones persistentes. En concreto, se han encontrado individuos asintomáticos infectados con virus dentro de tres de los cuatro géneros de la familia; en peces ^{86,87}, insectos ⁸⁸ y aves ³⁴.

En el caso específico de IBDV, se han publicado varios estudios que describen la presencia del virus en pollos asintomáticos que habían superado la enfermedad y en diferentes especies de aves silvestres⁸⁹⁻⁹¹.

Hace unos años se realizó un estudio en nuestro laboratorio que concluyó que IBDV es capaz de generar infecciones persistentes en células DT40, una línea procedente de un linfoma de pollo ⁹², infectados persistentemente con el virus de la leukosis aviar (ALV)⁹³. La presencia de AVL complica el análisis de los datos experimentales, ya que, podría facilitar de algún modo el establecimiento de la persistencia con IBDV.

A pesar de su enorme importancia potencial sobre la epidemiología de la enfermedad tanto a nivel de transmisión como el desarrollo de reservorios virales, la información acerca de los mecanismos implicados en el establecimiento de infecciones persistentes por birnavirus son prácticamente inexistentes.

7.2 Características generales de las infecciones persistentes.

La información disponible hasta la fecha en relación a la interacción de los elementos virales y celulares para establecer una infección persistente es extremadamente incompleta. Las infecciones persistentes son tan variopintas como los virus que las establecen, y podemos encontrar diversos mecanismos de acción que pueden ser empleados en solitario o en conjunto. Los mecanismos son dependientes del tipo de material genético del virus y del sitio de replicación dentro de la célula. Para que se produzca una infección persistente tienen que darse dos condiciones básicas, la primera, que el virus tenga una estrategia de replicación que produzca el mínimo daño en la célula y le permita permanecer en ella, la segunda, un sistema inmune que no reconozca al virus como agente patógeno ni, por supuesto, elimine la célula infectada ⁹⁴.

Ciertos virus son capaces de modular su expresión genética gracias a su capacidad de interacción con las histonas y la cromatina celular, el empaquetamiento del genoma permite

reprimir los genes implicados en la etapa lítica del ciclo viral y mantener de forma activa los implicados en latencia⁹⁵. Esto les permite entrar en un estado de latencia en el que no se produce replicación viral. Para que se dé este fenómeno el virus tiene que tener DNA como material genético y replicar en el núcleo celular.

En el caso de virus RNA, la represión de genes virales no ocurre y el virus siempre continúa replicado. En algunos casos, como es el del virus de la hepatitis C (HCV) a niveles muy elevados⁹⁶. En estos casos, lo más habitual es que los virus hayan desarrollado mecanismos que inhiban o bloqueen el sistema inmune. La inhibición de la apoptosis es uno de los mecanismos más comunes, ya que, a diferencia de lo que ocurre en una infección aguda, en la que el virus solo necesita a la célula hasta generar suficiente progenie viral, en una infección persistente la célula debe mantenerse funcional el mayor tiempo posible. Se han descrito una gran cantidad de mecanismos mediante los cuales diferentes virus persistentes inhiben la apoptosis. Por un lado están los que bloquean la ruta apoptótica⁹⁷, por otro los que producen proteínas homólogas a proteínas celulares con propiedades antiapoptóticas, como por ejemplo BCL-2⁹⁸. Encontramos también, virus que activan rutas de supervivencia y rutas antiapoptóticas, los que bloquean la proteína p53⁹⁹ e incluso los que utilizan miRNA, celulares o propios, para inhibir la traducción de genes proapoptóticos celulares¹⁰⁰. De la misma manera, la evasión del sistema inmune también tiene gran importancia en los procesos de establecimiento de persistencia. Se han descrito una gran variedad de estrategias: inhibición de la diferenciación de células dendríticas presentadoras de antígenos convencionales (cDCs), infecciones de células B y T⁹⁴, modificación en la producción y señalización de citoquinas, evitando de esta manera que los antígenos virales sean reconocidos por los receptores de células T (CTR), y/o inhibición específica de las células natural killer (NK)¹⁰¹.

Además de la interacción con las vías de señalización de la respuesta inmune hay otros elementos que se han descrito como causantes de la infección persistente. Los genomas virales defectivos (DVG) son genomas virales aberrantes con capacidad de interferir con la replicación viral e influir en el establecimiento de la persistencia. De hecho, se han descrito infecciones persistentes en birnavirus en que podrían estar relacionadas con la presencia de las DVGs⁸⁶.

8. Genomas virales defectivos.

Durante la replicación viral de virus RNA se producen mutaciones, deleciones y/o inserciones en el genoma viral dando lugar a material genético defectuoso denominado DVG¹⁰². Durante un largo periodo de tiempo se creyó que los DVGs eran elementos artefactuales fruto de la replicación continuada del virus *in vitro*. Sin embargo, estudios recientes han detectado la

presencia de DVGs en pacientes infectados por virus como HCV ¹⁰³, dengue ¹⁰⁴ o gripe ¹⁰⁵, confirmando de esta manera su presencia en infecciones naturales.

Con la información existente, se desconoce si los DVGs son producidos de manera estocástica o si, por el contrario, se generan de una forma predeterminada y con alguna finalidad específica. En algunos casos, como en el virus lock house ¹⁰⁶, la síntesis de DVGs es aparentemente aleatoria, mientras que en otros, por ejemplo en el virus respiratorio sincitial ¹⁰⁷, parece seguir un patrón predeterminado y repetitivo. Se han descrito diferentes proteínas virales responsables de la generación de DVGs. La más habitual es la RNA polimerasa dependiente de RNA que, debido a diferentes mecanismos cometen errores que provocan la síntesis de un gran número de DVGs ^{108,109}. Además se han descrito diversas proteínas relacionadas con la transcripción del genoma viral, como la proteína C del virus del sarampión o el virus de Sendai o la proteína NS2 del virus de la gripe, potencialmente involucradas en la aparición de estos genomas aberrantes ¹¹⁰⁻¹¹².

Durante el ensamblaje de la progenie viral se puede producir la incorporación de DVGs, estas denominadas partículas defectivas interferentes (DIP; *defective interfering particles*). Las DIPs pueden replicar en células coinfectadas con el virus WT e interferir con la replicación de éste ¹⁰².

8.1 Tipos de DVGs.

Los DVGs se pueden distinguir según el tipo de alteración genética que los produce. Los más habituales son los formados por una deleción durante la replicación del genoma. Estas deleciones pueden ser de mayor o menor tamaño, pero mantienen las regiones necesarias para la transcripción, la replicación y/o el empaquetamiento del genoma. Las deleciones pueden llegar a eliminar la secuencia completa de alguno o todos los genes esenciales para la propagación viral ¹¹³⁻¹¹⁵. En algunos casos se ha detectado la existencia de una reestructuración del genoma viral con la presencia de alteraciones genéticas tales como deleciones, inserciones, duplicaciones e inversiones de regiones del genoma ¹¹⁶⁻¹¹⁸.

Otras DVGs se producen por la incorporación de mutaciones que pueden afectar tanto a la funcionalidad de una o más proteínas virales o la modificación de la estructura secundaria de regiones del genoma relevantes desde un punto de vista funcional. Estas últimas son relativamente frecuentes en virus con genomas formados por RNA de cadena simple ^{119,120}.

Por último, se encuentran los copy-back DVGs que contienen una reorganización del genoma al producirse una duplicación reversa complementaria de este. Durante su formación se crea una estructura en forma de horquilla, probablemente producida por la separación de la RdRP de la hebra que está replicando y su unión a la copia que estaba siendo sintetizada. De esta forma, se

produce la replicación inversa complementaria de esta última. Este tipo de DVG se ha descrito en virus RNA de cadena simple negativa y forman estructuras con extremos 3' y 5' complementarios 118,121,122.

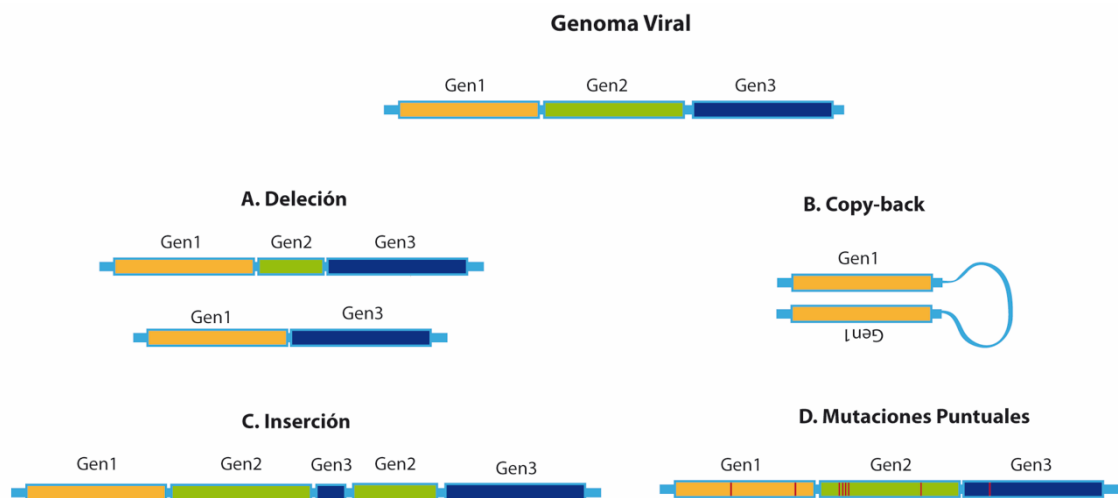


Figura 5: Diferentes tipos de DVG. La estructura de la DVG varía en función del proceso genético por el que se producen. **A. Delección.** Se producen por un salto(s) de la RNA polimerasa de una región a otra del segmento eliminando una o más regiones del genoma. **B. Copy-back,** la polimerasa hace un cambio de sentido y copia en reversa complementaria la misma secuencia que estaba replicando. Como resultado se produce una estructura en forma de horquilla o mango de sartén. **C. Inserción.** Se produce cuando la polimerasa salta a una región anterior del segmento, produciéndose duplicaciones de parte del genoma. **D. Mutaciones puntuales** introducidas durante la replicación que alteran la estructura secundaria del genoma y/o afectan a la funcionalidad de las proteínas codificadas por este.

8.2 Interacción de los DVGs con el virus.

Los DVGs interfieren con el proceso replicativo del virus provocando una disminución de la progenie viral infectiva. En estudios recientes se ha mostrado que los DVGs compiten con los genomas completos del virus por la polimerasa viral y las nucleoproteínas. Los DVGs de menor tamaño estarían favorecidos en el proceso replicativo, al necesitar menos tiempo y menor cantidad de nucleótidos para su replicación, produciéndose, a la larga, una mayor acumulación de estos en el citoplasma¹²³. A su vez, los segmentos defectivos del virus compitan con los segmentos completos en el ensamblaje viral dando lugar a los ya mencionados DIP. Por su parte, la transcripción de DVGs da lugar a proteínas truncadas, las cuales compiten con proteínas funcionales virales implicadas, entre otros procesos, en el ensamblaje¹²³.

La aparición de DVGs, y la competición por los elementos implicados en la replicación, se ha observado tras realizar infecciones con multiplicidades de infección (MOI) elevadas. Una mayor carga viral está relacionada con el incremento de la presencia de DVGs y la aparición de competición de éstos con genomas completos debido a su superior cinética replicativa ¹²⁴.

Además de la interferencia con la replicación, cuando se da la aparición de DVGs en el proceso infectivo se ha observado un comportamiento diferenciado de las células dentro de la monocapa. La presencia de DVGs produce diferencias fenotípica célula-célula. Se observan células con una elevada carga viral y baja cantidad de DVGs y, al mismo tiempo y de forma aleatoria, células que presentan una baja carga viral y gran acumulación de DVGs¹²⁵.

Además, la acumulación de grandes cantidades de DVGs activa las rutas de señalización iniciadas por los PRR, activando a su vez rutas de la respuesta inmune innata, como la ruta de señalización del IFN, que podrían tener funciones inhibitoras de la replicación viral ¹²⁶.

8.3 Interacción de los DVGs con el sistema inmune.

Los DVGs se han descrito como agentes desencadenantes de la respuesta innata, siendo reconocidos por los PRR y originando una fuerte respuesta. Los DVGs tienen capacidad de activación de la expresión de IFN de tipo I y III, TNF, interleuquina 6, interleuquina 1β y otras citoquinas pro-inflamatorias ¹²⁶⁻¹²⁸. Se han descrito casos en los que la infección con virus WT junto a DVGs produce una respuesta exacerbada de la ruta de señalización del INF, muy superior a la observada al infectar con el virus en solitario ¹²⁷, evento que resalta la elevada capacidad inmunogénica de algunos de estos genomas. La mayoría de los estudios realizados en relación a la interacción de DVGs con la respuesta inmune celular se han realizado con copy-back DVGs, por lo que todavía son necesarios más estudios para discernir cuáles son los DVGs más inmunoestimuladores, cuándo se produce la inmunoestimulación y por qué.

8.4 Persistencia y DVGs.

Los DVGs se han visto relacionados con el establecimiento de infecciones persistentes en diferentes virus RNA, incluyendo paramixovirus ¹²⁹, ebola ¹³⁰, virus de la stomatitis vesicular (VSV) ¹³¹, virus de la coriomeningitis linfocítica ¹³² o virus de la encefalitis japonesa¹³³. Estas infecciones persistentes con grandes cantidades de DVGs se han dado *in vitro* e *in vivo*, utilizando ratones como modelo experimental ¹³⁴. Además, un estudio realizado con cerebros de pacientes fallecidos por panencefalitis esclerosante subaguda, producida por la infección con el virus del sarampión, ha permitido localizar DVGs en el cerebro infectado ¹³⁵.

Durante mucho tiempo se ha relacionado la capacidad de los DVGs para convertir una infección aguda en una infección persistente con la competición, que estos experimentan junto a los segmentos completos, por los elementos implicados en la replicación. Durante el transcurso de la infección y debido a su mejor capacidad replicativa, los DVGs acabarían siendo dominantes en la mayoría de las células infectadas, por el contrario, los niveles de virus WT se verían muy reducidos. Durante el proceso de establecimiento de la persistencia se produciría una variación entre cantidad de DVGs y de genomas completos, habiendo etapas del proceso con mayor producción viral que otras. Después de un proceso adaptativo, llega un punto en el que se consigue un equilibrio entre ambos tipos de genomas, alcanzándose el establecimiento de persistencia^{136,137}.

Diversos estudios recientes indican que la competencia por la polimerasa no es el único factor, relacionado con las DVGs, implicado en el establecimiento de infecciones persistentes. Si no que también se han descrito casos en varios virus en los que los DVGs estarían activando señales de pro-supervivencia, evitando la muerte celular y como consecuencia fomentando el establecimiento de persistencia viral.^{125,138}

A pesar del avance en el estudio de DVGs y de la gran cantidad de datos obtenidos hasta la fecha, no se conoce un mecanismo exacto que aclare cómo los DVGs son capaces de favorecer la entrada en persistencia, y todavía se requiere de un estudio en profundidad para lograr descubrir y entender todos los elementos implicados. Lo que sí que se puede afirmar con seguridad es que los genomas defectivos están estrechamente relacionados con este fenómeno viral.

OBJETIVOS

A pesar de la existencia de vacunas eficaces, IBDV sigue siendo el agente patógeno que causa mayores pérdidas a la industria avícola mundial. Uno de los principales problemas de este virus es su reemergencia repentina en granjas con pollos, a priori, sanos. Una posible explicación a este fenómeno es la existencia de aves, domésticas o silvestres, infectadas de forma persistente que actúan como reservorios del virus

Un rasgo común de los birnavirus es la capacidad para establecer infecciones persistentes en sus hospedadores. A pesar de su extraordinaria relevancia acerca de la biología de este grupo de virus y de su enorme repercusión epidemiológica, al comienzo del trabajo experimental descrito en esta memoria, las bases moleculares que conducen a la persistencia de este grupo de virus eran completamente desconocidas.

El objetivo central de este trabajo es el de aportar información significativa acerca de este fenómeno empleando como modelo experimental IBDV, un patógeno aviar de gran importancia socioeconómica. Con esta finalidad nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollar metodologías para el establecimiento de infecciones persistentes de IBDV en líneas celulares estables.
2. Analizar genética y funcionalmente las poblaciones virales presentes en cultivos infectados de forma persistente.
3. Analizar genética y funcionalmente las líneas celulares infectadas persistentemente.
4. Emplear la información experimental aportada por los estudios descritos en los apartados anteriores para intentar identificar mecanismos implicados en el establecimiento de la persistencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

1.1 Células eucariotas

Durante la realización de esta tesis doctoral se han utilizado 5 líneas celulares eucariotas.

- DF-1: fibroblastos embrionarios de gallina doméstica (*Gallus Gallus*) transformados espontáneamente (ATCC, CRL-12203).
- DF-1P: fibroblastos embrionarios de pollo procedentes de células DF-1 infectadas persistentemente por IBDV.
- DF-1PC: fibroblastos embrionarios de pollo procedentes de células DF-1 infectadas persistentemente por IBDV y posteriormente curadas mediante tratamiento con 7-DMA.
- QM7: línea celular derivada de fibroblastos de codorniz japonesa (*Coturnix japonica*) (ATCC, CRL-1962).
- HeLa: células epiteliales de cáncer de cérvix humano (ATCC, CCL-2TM). Esta línea celular procede del laboratorio del Prof. Gideon Schreiber (Weizmann Institute of Science. (Israel)).
- HeLa IF2 KO: células epiteliales de cáncer de cérvix humano que han sido sometidas a un proceso de CRISPR-Cas9 para la eliminación del gen IFNAR-2. La línea fue amablemente cedida por el Prof. Gideon Schreiber (Weizmann Institute of Science. (Israel)).

Las líneas celulares se han mantenido a 37°C con una humedad relativa del 98% y una atmósfera con un 5% de CO₂ empleando medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) 169 (Gibco) suplementado con 100 U/ml de penicilina (Sigma-Aldrich), 100 U/ml de estreptomina (Sigma-Aldrich), 12 µg/ml de fungizona (Gibco), 50 µg/ml de gentamicina (Sigma-Aldrich) y una mezcla de aminoácidos no esenciales (Sigma-Aldrich). Además, el medio fue suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Sigma-Aldrich).

La conservación de las líneas celulares se realizó mediante congelación en nitrógeno líquido de suspensiones celulares (1x10⁷ células/ml) en un medio de congelación compuesto por 90% de FBS y 10% Dimetilsulfóxido (DMSO) (*Sigma-Aldrich*) como agente crioprotector.

1.2 Células procariontas

La amplificación de plásmidos recombinantes se realizó empleando la cepa E. Coli DH5α. Para la purificación de los plásmidos, se crecieron las células en medio de cultivo LB en agitación a 37°C. El medio LB fue suplementado con la concentración recomendada del antibiótico(s) de

elección. Para los cultivos en placa, se empleó medio LB suplementado con Bacto-Agar al 1,5% al que se añadió y se suplementó con la cantidad recomendada del antibiótico(s) de elección.

Las células bacterianas se mantuvieron a una temperatura de -80°C en medio LB suplementado con glicerol al 15 % .

1.2.1 Generación de bacterias competentes.

Las bacterias competentes fueron preparadas según indican *Inoue et al., 1990*¹³⁹. Para ello, se partió de una única colonia que fue crecida en medio LB líquido a una temperatura de 18°C hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.600) entre 0,6 y 0,7 unidades. A continuación, los cultivos se mantuvieron en hielo durante 10 min y posteriormente fueron sometidos a centrifugación a 3000xg durante 10 min a 4°C. Los sedimentos celulares se resuspendieron en tampón de transformación TB (10 mM PIPES pH 6,7, 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂ y 250 mM KCl₂) y se mantuvo en hielo durante 10 min. Después de un segundo paso de centrifugación en las mismas condiciones, los sedimentos celulares resultantes fueron resuspendidos en tampón TB suplementado con DMSO al 7% y distribuido en alícuotas que se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

1.2.2 Transformación bacteriana.

Para la transformación bacteriana, se añadió el DNA plasmídico sobre una alícuota de 50 µl de bacterias competentes y se mantuvo en hielo durante 30 min. A continuación, las bacterias se sometieron a un choque térmico (1 min 30 seg a 42°C y 10 min en hielo). Se añadió medio LB y se incubó durante 1 h en agitación a 37°C. Las bacterias se sembraron en placas de LB suplementado con el antibiótico correspondiente y se incubaron durante toda la noche a 37°C.

1.3 Virus

- IBDV. El virus empleado en este trabajo es un derivado de la cepa Soroa perteneciente al serotipo I aislado originalmente en Cuba y adaptado a crecer en cultivos celulares (DOI: 10.1099/0022-1317-79-5-1047). En algunos experimentos se emplearon las cepas P2 y Bursine, ambas pertenecientes al serotipo 1. Estas cepas virales fueron cedidas por el Prof. Nicolas Eterradosi (VIPAC Unit, ANSES, Ploufragan, Francia).
- Vesicular Stomatitis Virus (VSV). Perteneciente a la familia Rhabdoviridae con un genoma ssRNA de cadena negativa. Se ha empleado un virus recombinante denominado VSV-GFP que expresa la proteína verde fluorescente (GFP)¹⁴⁰.
- Virus del bosque de Semliki (SFV). Perteneciente a la familia *Togaviridae* con un genoma ssRNA de cadena positiva. Se empleó una versión recombinante denominado SFV-GFP-

Luc que expresa los genes reporteros GFP y Luciferasa. Este virus fue cedido por el Dr. Christian Smerdou (CIMA Universidad de Navarra. Pamplona)

- Reovirus aviar. Virus perteneciente a la familia *Reoviridae* con un genoma dsRNA. Cedido por el Dr. José Manuel Martínez Costas (CIQUS, Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela).

2. Reactivos

2.1 Plásmidos.

Durante el desarrollo de esta tesis se han empleado los siguientes plásmidos:

- pCINEO: Vector de expresión eucariótica que contiene el promotor inmediatamente temprano del citomegalovirus (CMV). Contiene genes de resistencia a ampicilina y a neomicina.
- pCINEO-chIFNAR2. Derivado de pCINEO que contiene la secuencia del gen IFNAR2 de pollo bajo el control transcripcional del promotor de CMV.
- pGEM-T easy (Promega): Vector plasmídico empleado para el clonaje de fragmentos de DNA generados mediante PCR. Contiene el gen de resistencia a ampicilina.
- pEGFP-C1 Clontech): Plásmido que expresa la proteína GFP. Se ha utilizado como control de transfección.

2.2 Anticuerpos.

Los anticuerpos empleados se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Anticuerpos empleados durante el transcurso de este trabajo.

Anticuerpo	Antígeno	Especie	Tipo	Uso/ Dilución	Referencia
anti-Mx1/2/3	Región interna de la proteína humana MX-1 (aminoácidos 171-455)	Conejo	Policlonal	WB/1:250	sc-50509 Santa Cruz Biotechnology
anti-PARP	Péptido sintético que contiene el sitio de corte por caspasas	Conejo	Policlonal	WB/ 1:500	#9542 Cell Signalling

Anti β-actin (C4)	Proteína β -actina aviar	Ratón	Monoclonal	WB/ 1:1.000	sc-47778 Santa Cruz Biotechnology
VP3 (918)	Proteína VP3 de IBDV	Conejo	Policlonal	WB/ 1:1.000 IF/ 1:1000	Producido en el laboratorio
Anti-conejo IgG- peroxidasa	Anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa de rábano	Cabra	Policlonal	WB/ 1:5.000	Sigma-Aldrich
Anti-ratón IgG- peroxidasa	Anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa de rábano	Cabra	Policlonal	WB/ 1:5.000	Sigma-Aldrich
α-IgG- Alexa Fluor	Anticuerpos secundarios frente a IgG de ratón, conejo o rata, conjugados con Alexa Fluor 488, 546, 594, 647	Cabra	Policlonal	IF/ misma dilución que el primario	Life Technologies

2.3 Cebadores

Los oligonucleótidos empleados se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Cebadores empleados durante el transcurso de este trabajo.

Nombre	Cebador Forward (5'-3')	Cebador Reverse (5'-3')
chGAPDH	ATCAAGAGGGTAGTGAAGGCTGCT	TCAAAGGTGGAGGAATGGCTGTCA
chMx	TTCACGTCAATGTCCCAGCTTTGC	ATTGCTCAGGCGTTTACTTGCTCC
chOAS	GCAGAAGAACTTTGTGAAGTGGC	TCGGCTTCAACATCTCCTTGTACC
chIFN β	ACCAGGATGCCAACTTCTCTTGA	ATGGCTGCTTGCTTCTTGTCTTG
hHPRT	TGACACTGGCAAACAATGCA	GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT
hMxt	ACAGGACCATCGGAATCTTG	CCCTTCTCAGGTGGAACAC
VP3	AAGGGCAGCTACGTGATCTAC	TGGCAACTTCGTCTATGAAAGC
OL_IFNAR2	CCATCCCATCAGCCTGGAAAT	TGCACATTGCCAGTCAACAG
Segmento A	GGGATACGGGGTCTGGGATTAG	GACCCGGAACGGATCCAATTTG
Segmento B	GGGAGTCACGAATTAACGTGGC	GGGATACGGGGTCTGGGATTAG

2.4 Otros reactivos.

La Tabla 3 contiene un listado de los reactivos biológicos más relevantes empleados a lo largo del trabajo experimental.

Tabla 3. Reactivos empleados durante el transcurso de este trabajo.

Nombre	Descripción	Casa comercial
7-deaza-2'-C-metiladenosina (7DMA)	Análogo de adenosina que actúa como inhibidor de RdRp virales	Santa Cruz Biotechnology

DAPI	Sonda fluorescente para teñir dsDNA	Life Technologies
Prolong Gold	Medio de montaje líquido para experimentos de microscopía de fluorescencia	Life Technologies

3. Métodos.

3.1 Infecciones virales.

Excepto en los experimentos indicados de forma específica, las infecciones con IBDV se realizaron empleando una MOI de 3 UFP/célula. Las infecciones con VSV-GFP y Reovirus aviar se realizaron con una MOI de 1 UFP/célula, mientras que las infecciones con el virus SFV-GFP-Luc fueron realizadas con 10 UFP/célula. Todas las infecciones se realizaron en monocapas celulares pre-confluentes (70-80%). Los inóculos se prepararon en medio DMEM carente de suero. La adsorción de los diferentes virus se realizó durante 1 h utilizando el volumen mínimo de inóculo necesario para evitar la desecación de las monocapas. Durante este periodo, los cultivos fueron agitados con suavidad cada 15 min. Tras el periodo de adsorción, los inóculos fueron reemplazados por medio DMEM suplementado al 2% de FBS. Los cultivos fueron mantenidos a 37°C en una atmósfera con un contenido de 5% de CO₂ y una humedad relativa del 98%.

3.2 Titulación de IBDV.

Las determinaciones del título viral en muestras procedentes de células infectadas con IBDV se llevaron a cabo empleando dos métodos alternativos: i) mediante recuento del número de placas de lisis; o ii) mediante el cálculo del TCID-50. En ambos casos, cultivos en monocapa de células QM7 fueron infectados con diluciones seriadas de las muestras a analizar. La detección de placas de lisis se realizó siguiendo el protocolo descrito por Méndez et al. (2015)⁶. Por su parte, el TCID-50 se calculó empleando el algoritmo descrito por Hierholzer y Killington (1996)¹⁴¹, empleando los datos correspondientes a la detección del efecto citopático inducido por el virus detectado mediante microscopía de contraste de fase a los 6 días p.i.

3.3 Transfecciones.

Durante el desarrollo de la tesis se han realizado transfecciones empleando dos agentes de transfección diferentes: Lipofectamina 2000 (ThermoFisher) y FugeneHD (Promega). Las transfecciones fueron realizadas siguiendo las recomendaciones de cada fabricante. Utilizando

diferentes concentraciones de plásmido y diferentes relaciones DNA/agente de transfección, se determinaron las condiciones óptimas de transfección para las dos diferentes líneas celulares, DF1 y QM7, empleadas. La puesta a punto de las condiciones de transfección se determinaron empleando el plásmido pEGFP-C1 (Clontech) que expresa la proteína verde fluorescente (GFP).

Las células fueron sembradas 24 h antes de la transfección, empleando una concentración que permitiera el desarrollo de monocapas con un 60-70% de confluencia al inicio de los experimentos. Tras la transfección, los cultivos se mantuvieron el tiempo necesario según las características del experimento, normalmente entre 24 y 48 h.

3.4 Preparación de inóculos de IBDV.

Los inóculos se prepararon mediante la infección con una MOI 0,05 UFP/célula de cultivos en monocapa de células QM7. El medio de los cultivos infectados fue recogido cuando el efecto citopático inducido por el virus afectaba aproximadamente al 50% de las células. A continuación, el medio fue sometido a centrifugación durante 15 min a 3.000xg para eliminar restos celulares. Los sobrenadantes se recogieron y mezclaron en una relación 1:5 (v/v) con una solución de polietilenglicol 8.000 (Sigma-Aldrich) al 20% en una solución 3 M NaCl. Tras un periodo de incubación de 16 h 4°C con agitación suave, la mezcla fue sometida a centrifugación, 1.000xg durante 30 min a 4°C. El sedimento fue resuspendido en tampón PES (50 mM PIPES pH 6,2, 150 mM NaCl, 20 mM CaCl₂) suplementado con inhibidores de proteasas (*cOmplete protease inhibitor cocktail EDTA-free, Roche*) y nuevamente se centrifugó a 1000xg durante 30 min para eliminar agregados. El sobrenadante obtenido fue depositado sobre un colchón de sacarosa al 25% en tampón PES y ultracentrifugado a 170.000xg durante 150 min. El precipitado resultante se resuspendió suavemente en tampón PES. Todas las etapas de purificación fueron realizadas a 4°C. Por último, para una mejor conservación del virus, se añadió glicerol al 10%. Los inóculos se mantienen en alícuotas de 50-100 µl a una temperatura de -80°C. Los títulos de los inóculos fueron determinados mediante recuento del número de placas de lisis.

3.5 Extracción y manipulación de ácidos nucleicos.

3.5.1 Purificación RNA.

Las muestras de RNA se obtuvieron mediante extracción a partir de cultivos celulares. Las extracciones se realizaron empleando el kit *NucleoSpin RNA, Mini kit for RNA purification* (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de DNA fue determinada mediante espectrofotometría empleando un aparato NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies). Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su utilización.

3.5.2 Purificación de DNA.

3.5.2.1 *Purificación de DNA plasmídico.*

Las muestras de DNA plasmídico se obtuvieron a partir de cultivos bacterianos en suspensión empleando los kits *NucleoSpin Plasmid* (Macherey-Nagel) o *NucleoBond Xtra Midi Plus* (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de DNA en las muestras fue determinada mediante espectrofotometría empleando el aparato NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies). Las muestras de DNA fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

3.5.2.2 *Purificación de DNA genómico celular.*

Se realizó mediante extracción a partir de cultivos celulares empleando el kit *Blood and Cell culture DNA mini kit (25)* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de DNA de las muestras obtenidas fue determinada mediante espectrofotometría empleando el aparato NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies).

3.5.3 Reacciones de PCR.

Las reacciones se realizaron empleando el kit de *PCR Master mix* (Promega) que contiene Taq polimerasa, los desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), MgCl₂ y el tampón de reacción. El protocolo de amplificación fue el siguiente: un paso de desnaturalización (2 min a 95°C) seguido por 30 ciclos de amplificación (1 min a 95°C, 1 min a 60°C, 1 min a 72°C por cada kb de DNA a amplificar). Tras la amplificación, las muestras fueron mantenidas a 72°C durante 5 min y posteriormente almacenadas a 4°C hasta su uso. Como se especifica en el apartado de resultados, en algunos casos las reacciones de PCR se llevaron a cabo empleando *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del productor.

3.5.4 Purificación de productos de PCR.

La purificación de productos de PCR se realizó empleando el kit *Nucleospin gel and PCR Clean-Up* (Macherey-Nage), siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.5.5 Retrotranscripción del RNA.

La obtención de cDNAs a partir de muestras de RNA purificado se realizó empleando cantidades de RNA de entre 150 y 500 ng utilizando la enzima *SuperScrip III* (ThermoFisher) empleando hexanucleótidos aleatorios de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3.6 Análisis bioquímicos.

3.6.1 PCR cuantitativa a tiempo real.

Muestras de cDNA preparadas como se ha descrito anteriormente, se emplearon para cuantificar la transcripción de los genes de interés mediante PCR cuantitativa (qPCR). Las reacciones se llevaron a cabo usando los cebadores específicos descritos en la tabla 2 y el reactivo comercial *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (ThermoFisher) en un termociclador *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. Como patrón para la cuantificación y normalización de transcritos humanos y de pollo se emplearon cebadores específicos para los genes hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT) humana y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de pollo, respectivamente. Los datos obtenidos se representan en unidades relativas. Inicialmente se determinó la concentración óptima de cada par de cebadores. La optimización de las reacciones se realizó a partir de plásmidos que contenían las secuencias a amplificar por cada pareja de cebadores. Se hicieron diluciones seriadas de los mismos 1/10 para obtener las curvas patrón. Estas curvas cumplían con los parámetros de regresión lineal (0,99-1) y los valores de pendiente (cercanas a -3,2) que miden la eficiencia de la reacción. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos, en las que se incluían las muestras correspondientes a las curvas patrón, una dilución 1/10 de las muestras de cDNA, y los controles negativos respectivos.

3.6.2 Inmunodetección de proteínas.

La caracterización de la expresión proteica se realizó mediante inmunodetección (Western blotting, WB). Para ello, se prepararon extractos celulares que fueron resuspendidos en tampón de electroforésis (12 mM TrisHCl pH 6,8, 0,2% SDS, 0,012% azul de bromofenol, 5% glicerol y 2 mM DTT). Los extractos fueron sometidos a electroforésis en geles desnaturizantes de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) al 12% o en geles en gradiente 5-15%. Después de la separación electroforética, los geles fueron electro-transferidos en condiciones semi-secas durante 1 h a 200 mA a membranas de nitrocelulosa (Protran, Schleicher & Schuell). Tras la transferencia, las membranas incubadas en solución de bloqueo (leche desnatada en polvo al 5% en TBS-tween 0,05%) durante 30 min a temperatura ambiente (TA) y posteriormente incubadas con el correspondiente anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo durante 2 h a TA o durante toda la noche a 4°C. Tras tres lavados de 10 min con PBS, las membranas se incubaron 2 h a TA con un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo o de ratón conjugado a peroxidasa (GE Healthcare) diluido 1:2.500 en solución de bloqueo. Tras tres lavados con PBS durante 10 min, las proteínas inmunoreactivas fueron detectadas bien mediante quimioluminiscencia empleando sistema

comercial ECL (BioRad), utilizando el aparato *ChemiDoc Touch Imaging System* (Bio-Rad), o mediante la adición de 4-cloro-1-naftol en presencia de 0,025% de H₂O₂.

3.6.3 Inmunofluorescencia (IF).

Para los ensayos de IF se utilizaron cultivos celulares en monocapa crecidas sobre cristales cubreobjetos a una confluencia aproximada del 70%. Las células se fijaron durante 15 min a TA con una solución al 4% de paraformaldehído (PFA) y a continuación se lavaron tres veces con PBS. Las muestras se bloquearon y permeabilizaron simultáneamente con PBS suplementado con 5% FBS y 0,25% saponina (p/v) durante 30 min a TA. Los diferentes anticuerpos primarios se incubaron en PBS suplementado con 5% FBS y 0,25% saponina, durante un tiempo mínimo de 90 min a TA. Tras un lavado intensivo con PBS, las muestras se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a los fluorocromos indicados diluidos en PBS suplementado con 5% FCS y 0,25% saponina durante 90 min a TA. Los núcleos celulares se tiñeron con 2-(4-aminofenil)-1H-indol-6-carboxamida (DAPI) (Sigma) diluido en PBS durante 15´a RT. Finalmente, las muestras se lavaron cinco veces con PBS y se montaron sobre portaobjetos de vidrio utilizando *ProLong® Gold Antifade* (ThermoFisher).

La adquisición de las imágenes se realizó en el sistema confocal Leica TCS SP8 con módulo STED 3x (Leica Microsistemas), equipado con un diodo para excitación a 405 nm, un láser blanco (WLL2) para excitación en el rango 470 a 670 nm, láseres de depleción de 592 y 660 nm y detectores híbridos con sistemas de selección temporal de la señal emitida (“gating”).

La adquisición de imágenes confocales se ha realizado mediante el software LAS X v. 3.5.5 de forma secuencial, empleado un objetivo HCX Plan Apo CS2 63x/1.40 N.A. de inmersión en aceite con una distancia de pasada en el eje z en un rango variable 0,13-0,6 µm (z-step size).

3.6.4 Determinación de la viabilidad celular.

Estas determinaciones se llevaron a cabo sobre cultivos celulares en monocapa empleando un ensayo colorimétrico basado en el empleo del agente de tinción bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, transcurrido el tiempo requerido para el ensayo el medio de los cultivos a analizar fue substituido por una solución de MTT (5 mg/ml) en PBS diluida en proporción 1:20 en medio DMEM suplementado con 10% de FBS. A continuación, los cultivos fueron incubados a 37°C durante 30 min. En ese momento el medio fue reemplazado por dimetilsulfóxido (DMSO) y los cultivos incubados a TA en agitación durante 20 min. Pasado ese tiempo, el sobrenadante de los cultivos fue recogido y utilizado para determinar su absorbancia a 590 nm con un lector de

placa multifunción basado en filtros: Appliskan (ThermoFisher). Los experimentos se realizaron empleando triplicados independientes. Los valores de absorbancia obtenidos en cultivos no tratados o infectados se emplearon para definir el 100% de viabilidad.

3.6.5 Determinación de la actividad apoptótica.

Se realizó empleando el kit *Caspase-Glo 3/7 assay* (Promega) que permite la detección mediante luminiscencia de la actividad de las caspasas 3 y 7, componentes esenciales de la ruta apoptótica. Las determinaciones se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante empleando un lector de placa multifunción basado en filtros: Appliskan (ThermoFisher).

3.7 **Análisis estadístico.**

Se empleó el programa *Graphpad Prism* para determinar la significación estadística de los datos numéricos obtenidos. Los experimentos con varios grupos se analizaron usando el test ANOVA, seguido del test “post-hoc” correspondiente: i) test de Dunnett en el caso de comparar todas las condiciones respecto de una condición control, ii) test de Tukey en caso de comparar todas las condiciones entre sí. En los experimentos con tan sólo dos grupos se utilizó una prueba T de student de dos colas utilizando el método de corrección Holm-Sidak. Los corchetes indican comparación de datos por parejas. A partir del p-valor se muestra el nivel de significancia estadística (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

3.8 **Secuenciación masiva.**

3.8.1 Secuenciación del genoma de IBDV.

Se realizó una secuenciación completa del genoma de IBDV, para ello se realizó la técnica de secuenciación anteriormente descrita por Soubies et al. (2017)¹⁴², con alguna modificación menor. El RNA se extrajo de cultivos celulares de DF1 infectados con el virus WT o de células DF1-P, utilizando el kit *RNeasy mini kit (50)* (Quiagen) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada uno de los segmentos del genoma fueron amplificados por RT-PCR en dos fragmentos utilizando los cebadores descritos en Soubies et al. (2017)¹⁴². La secuenciación del genoma completo se realizó en las dos direcciones en tres productos de PCR completamente independientes.

3.8.2 Análisis de alto rendimiento del genoma celular (High-throughput sequencing).

Para el análisis del DNA genómico procedente de cultivos celulares de DF-1 y DF-1PC se utilizó el kit de Quiagen previamente indicado como método de purificación, siguiendo las instrucciones del fabricante. Una cantidad final de 1,5 mg de DNA por muestra fue utilizada para realizar el experimento. La construcción de la librería, la secuenciación de alto rendimiento, el alineamiento

de las secuencias, y la detección de SNP e InDels y las anotaciones fue realizada por CD Genomics (NY, USA).

3.8.3 Secuenciación de RNA utilizando la tecnología de Illumina HiSeq.

Para el análisis del RNA viral se utilizaron muestras de RNA procedentes de células QM7 infectadas con diferentes MOIs de IBDV: MOI 100, 10, 1 y 0'1 UFP/célula, purificadas mediante el kit *RNeasy mini kit (50)* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad del RNA se midió con un análisis del número de integridad del RNA (RIN, *RNA Integrity Number*). La empresa *CD Genomics* fue la encargada de realizar el procesamiento previo de las muestras: eliminar el DNA residual y deplecionar del RNA ribosómico, la generación de la librería y la secuenciación.

El resultado es la obtención de lecturas de 150pb correspondientes a todo el RNA mensajero de la muestra.

3.8.4 Análisis bioinformático de la secuenciación de RNA.

En primer lugar, las lecturas obtenidas por NGS se filtraron por calidad usando *NGSQCToolki*¹⁴³. Las lecturas resultantes fueron mapeadas sobre el genoma de IBDV (AF140705) usando el software *bowtie 2*¹⁴⁴ (URL: <http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>). La cobertura en cada posición se analizó utilizando el programa R¹⁴⁵ (URL: <https://www.R-project.org/>). Las lecturas filtradas se mapearon asimismo contra el genoma de referencia *Coturnix japonica* obteniendo el NCBI usando *RNA-STAR*¹⁴⁶.

La presencia de anomalías en las secuencias de las lecturas correspondientes con genomas virales defectivos (DVGs) se realizó utilizando *DI-TECTOR*¹⁴⁷. Se emplearon todas las lecturas filtradas y se compararon con los genomas de *Coturnix Japonica* e IBDV de referencia. Adicionalmente se hizo una búsqueda empleando las secuencias descartadas tras el alineamiento con el genoma de *C. Japonica*, alineándolas contra el genoma de IBDV con *BLAST*¹⁴⁸ y analizando las coincidencias dobles, triples y cuádruples con *R*. Los resultados obtenidos de análisis de cobertura y análisis de genomas virales defectuosos se sometieron a un análisis espectral con *R*, empleando el paquete "EMD"¹⁴⁹ para detectar periodicidades en los puntos de recombinación. Todo el análisis bioinformático ha sido realizado por el servicio de informática científica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB).

RESULTADOS

1. Establecimiento de infecciones persistentes por parte de IBDV.

1.1 IBDV es capaz de establecer infecciones persistentes estables en cultivo celular.

La infección de cultivos de células susceptibles a IBDV, tales como DF-1, QM7 o células HeLa, con una MOI de 2 -3 UFP/célula provoca una muerte celular generalizada durante las primeras 48-72 h p.i. Sin embargo, en nuestro laboratorio se había advertido de forma reiterada la existencia de poblaciones celulares muy reducidas aparentemente capaces de sobrevivir a la infección. Esta observación recurrente nos llevó a iniciar un estudio encaminado a caracterizar de forma sistemática estas poblaciones aparentemente resistentes a la infección. Con este propósito, se infectaron monocapas de células DF-1. Los cultivos infectados se mantuvieron durante 5 días. Pasado este periodo, con el fin de eliminar los restos celulares, los cultivos fueron sometidos a dos lavados con medio DMEM y mantenidos en medio DMEM suplementado con 20% de FBS durante 21 días. El medio de estos cultivos fue reemplazado por medio fresco cada cinco días. Como puede apreciarse en la **Figura 6.A**, durante este periodo las células supervivientes forman colonias fácilmente detectables mediante tinción con cristal violeta. Es importante resaltar la existencia de una gran heterogeneidad en el tamaño de las colonias. Mientras algunas están formadas por cientos de células, otras no son detectables a simple vista. Con independencia del tamaño de las colonias, las células que las integran muestran una morfología indistinguible de la de las células DF-1 no infectadas cuando se observan mediante microscopía de contraste de fase (**Figura 6.B**). Con el fin de determinar si las células supervivientes estaban infectadas por IBDV, los cultivos fueron analizados mediante inmunofluorescencia (IF) utilizando un anticuerpo contra la proteína viral VP3. Como se muestra en la **Figura 6.C**, las células de todas las colonias analizadas presentaban una clara señal inmunofluorescente, lo que sugiere que están persistentemente infectadas. Dado el origen de estas células se les empezó a denominar DF-1 persistentemente infectadas (DF-1P).

Asumiendo un origen clonal para las colonias detectadas a los 21 días p.i., la tasa de supervivencia de las células DF-1 a la infección por IBDV, en las condiciones experimentales empleadas, estaría comprendido entre 0,023 y el 0,007%.

A partir de los 21 días p.i., los cultivos fueron mantenidos hasta el establecimiento de monocapas celulares posteriormente propagadas de forma rutinaria mediante pases sucesivos. La experiencia acumulada indica que durante los dos o tres primeros meses los cultivos infectados de forma persistente sufren crisis periódicas de mortalidad celular masiva que pueden afectar hasta al 50-70% de las células en cultivo. Estos episodios se tornan muy infrecuentes con el paso del tiempo.

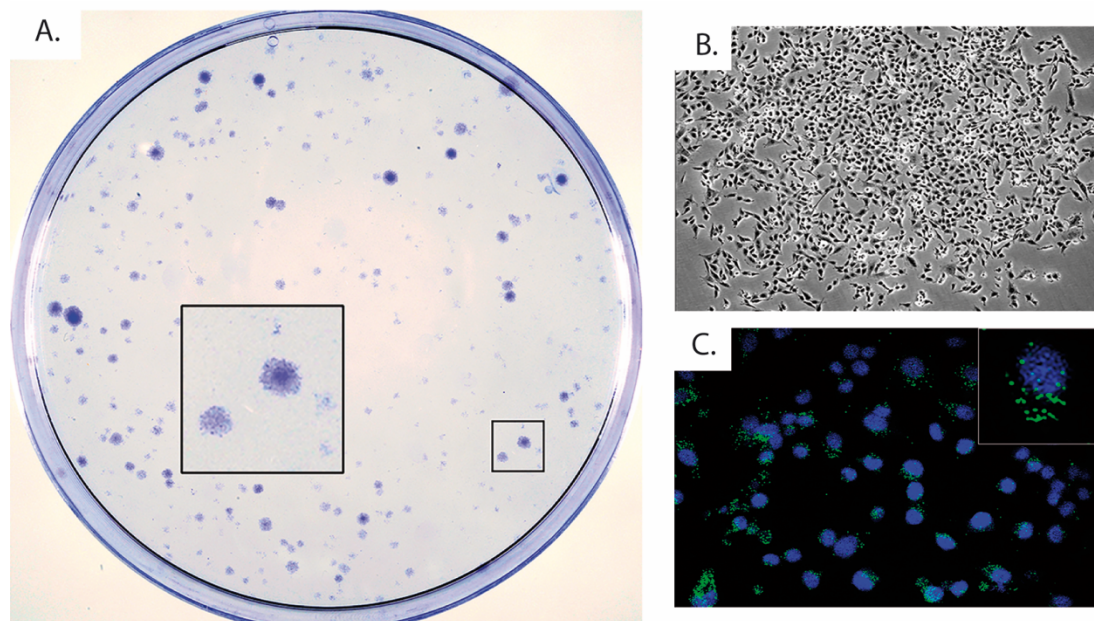


Figura 6. Generación de células infectadas persistentemente por IBDV. Infección de una monocapa con una MOI de 3 UFP/mL de IBDV, transcurridos 4 días eliminación del medio, lavados con PBS y adición de medio DMEM complementado al 10% de FBS. Transcurridos 21 días, cambiando el medio de cultivo cada 5, las placas fueron tratadas con cristal violeta (A), observadas al microscopio y obtención de fotos con campo claro (B) e IF utilizando anticuerpos que reconocen la proteína estructural de IBDV VP3 (verde), los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). La célula ampliada tiene una magnificación mayor que la observada en la imagen de IF (2,5X) (C).

1.2. Caracterización de las células DF-1 persistentes.

Los cultivos de células DF-1P fueron mantenidos en cultivo durante un periodo de 180 días como forma de asegurar que se trataba de una línea estable con capacidad de permanecer en cultivo mientras estaba infectada por IBDV. Una vez hubo certitud de que la línea se mantenía persistentemente infectada y estable, se comenzó con el proceso de estudio y caracterización de estas líneas celulares.

En primer lugar, nos propusimos analizar la expresión de proteínas virales, de RNA viral y la posible presencia de virus liberado al medio extracelular. En todos los ensayos realizados se utilizaron células DF-1P. Como controles, se emplearon cultivos de células DF-1 sin infectar o infectados con IBDV. Las muestras procedentes de estas últimas fueron recogidas a las 18 h p.i.

El primer lugar se realizó un ensayo de IF frente a la proteína VP3. Como habíamos observado previamente en las colonias iniciales, todas las células DF-1P analizadas mostraron una clara señal inmunofluorescente. Sin embargo, la intensidad de la señal es significativamente inferior a la observada en los cultivos de células DF-1 infectadas de forma aguda. Por otra parte, el patrón de distribución subcelular en células DF-1P es mucho más punteado que el detectado en células infectadas de forma aguda (**Figura 7.A**). De forma similar, el análisis mediante WB mostró que la acumulación de la proteína VP3 en células DF-1P es muy inferior a la observada en cultivos infectados de forma aguda (**Figura 7.B**).

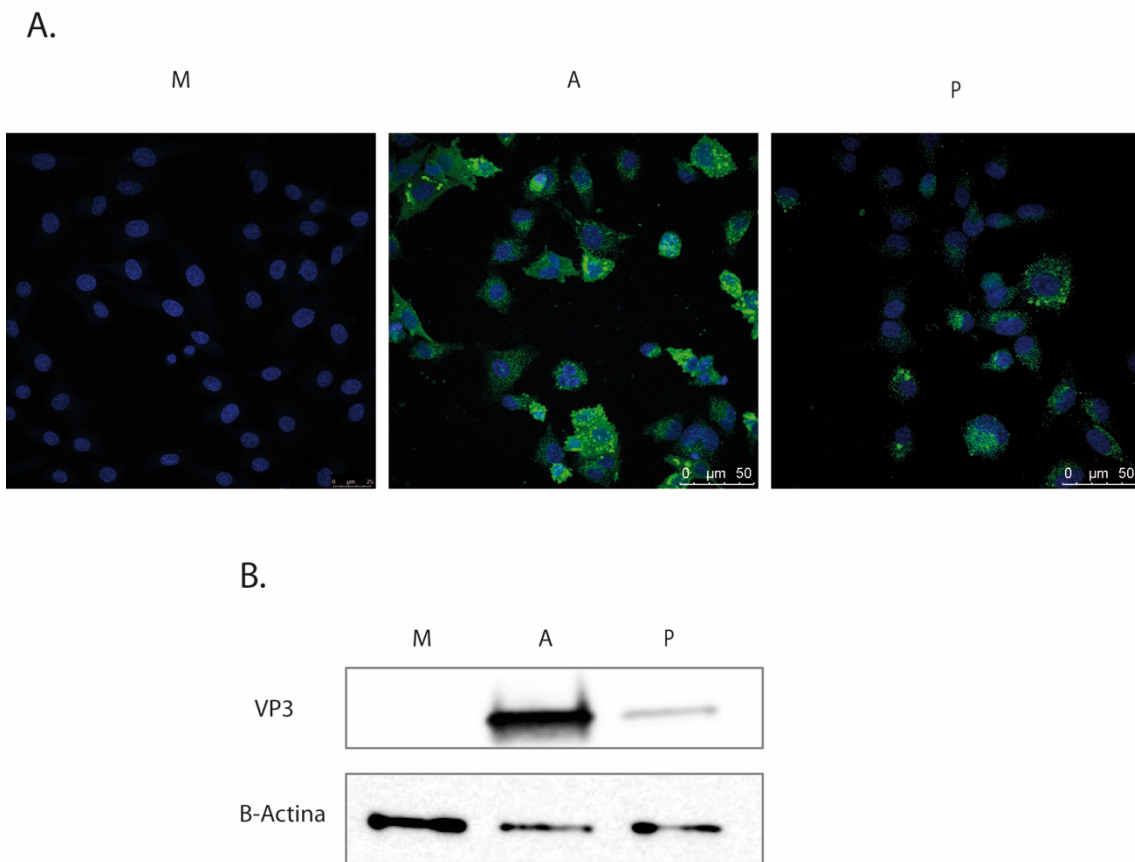


Figura 7. Caracterización de las células DF-1P. Células DF-1P (P) mantenidas en cultivo durante 180 días fueron utilizadas para medir la expresión de proteínas virales. Células DF-1 mock (M) e infectadas (3 UFP/célula) y recogidas 18 h.p.i. (A) fueron utilizadas como control en el análisis. **A.** IF con anticuerpo contra la proteína viral estructural VP3 y tinción de núcleo con DAPI. **B.** Las muestras celulares fueron sometidas a un SDS-PAGE y posterior WB utilizando anticuerpos que reconocen la proteína viral VP3 o actina celular.

Por su parte, la cuantificación de RNA viral mediante RT-qPCR en las diferentes muestras reveló la existencia de una reducción superior a dos unidades logarítmicas en DF-1P con respecto al valor detectado en células infectadas de forma aguda (**Figura 8.A**). Finalmente, las titulaciones

realizadas a partir de muestras de medio de cultivo, mostraron que la presencia de virus infeccioso en los cultivos de células DF-1P es casi cuatro unidades logarítmicas inferior a la detectada en cultivos DF-1 infectados de forma aguda (**Figura 8.B**).

Este conjunto de resultados confirmó de forma plena la infección persistente en los cultivos de células DF-1P, así como que la capacidad replicativa durante la persistencia es muy inferior a la observada en células infectadas de forma aguda.

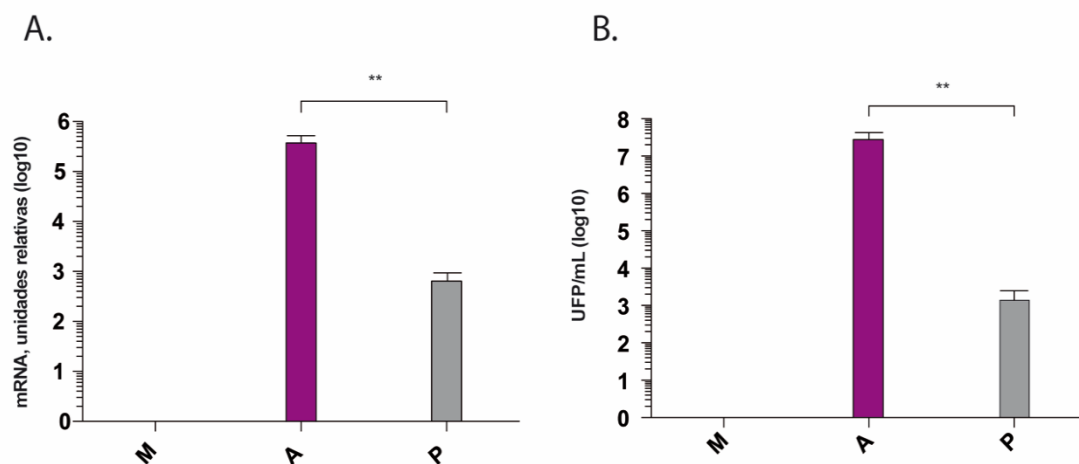


Figura 8. Caracterización de las células DF-1P. Células DF-1P (P) mantenidas en cultivo durante 180 días fueron utilizadas para medir la acumulación de RNA viral y la producción de virus infeccioso extracelular. Células DF-1 mock (M) e infectadas (3 UFP/célula) y recogidas 18 h.p.i. (A) fueron utilizadas como control en el análisis. **A.** RNA extraído de las células sometido a RT-qPCR con cebadores que hibridan en el segmento A de IBDV. **B.** Medición del título viral en el sobrenadante de los diferentes cultivos celulares. Las barras de error corresponden con valores obtenidos de tres experimentos independientes. Los corchetes indican la comparación por parejas. ** $p < 0,001$ se utilizó una prueba T de student de dos colas utilizando el método de corrección Holm-Sidak.

1.3. Caracterización del virus presente en las células persistentes.

Los resultados descritos en el apartado anterior indican que la replicación de IBDV en células persistentemente infectadas es significativamente inferior a la observada en células infectadas de forma aguda. Esta observación nos llevó a plantear la hipótesis de que en las células capaces de sobrevivir a la infección aguda podrían haberse dado la selección de una población viral mutante con una inferior capacidad replicativa. Para analizar esta hipótesis, se llevó a cabo la secuenciación de RNA viral extraído a partir de cultivos infectados de forma aguda y persistente (ver M&M). El análisis de las secuencias de ambos segmentos genómicos como de las proteínas

codificas por las diferentes ORF no mostró la existencia de diferencias significativas. La comparación de las secuencias obtenidas mostró niveles de identidad del 97'3% y del 98%, para los segmentos A y B, respectivamente (**Figura 1 y Figura 2 anexos**). De forma similar, la comparación de las secuencias proteicas mostró niveles de identidad del 97'9%, 98'2% y 99'5% en las comparaciones realizadas con las proteínas VP5, poliproteína y VP1, respectivamente (**Figura 3 anexos**). Estos resultados nos permitieron descartar la existencia de grandes diferencias en el genoma de la población viral presente en células infectadas persistentemente, pero no la de la posible contribución de las mutaciones puntuales detectadas en la disminución de la capacidad replicativa del virus. Por ello, decidimos comparar de forma directa la replicación de virus aislado a partir de un cultivo persistente y la del virus parental.

Para ello se realizaron infecciones en células DF1 con el virus WT y con el virus procedente de células persistentes. Como el título del virus procedente de las células persistentes era muy reducido (10^3 UFP/mL), estas infecciones fueron realizadas empleando una MOI de 0,005 UFP/célula. Una vez realizadas las infecciones, se recogieron muestras de medio de cultivo a diferentes tiempos p.i. (24, 48 y 72 h). Estas muestras fueron empleadas para caracterizar la producción de virus extracelular en ambas infecciones.

En contra de la hipótesis inicial, los resultados obtenidos indican que la capacidad de replicación del virus procedente de células persistentemente infectadas es superior al del virus parental, produciendo títulos 10 veces superiores a 48 y 72 h p.i. (**Figura 9**).

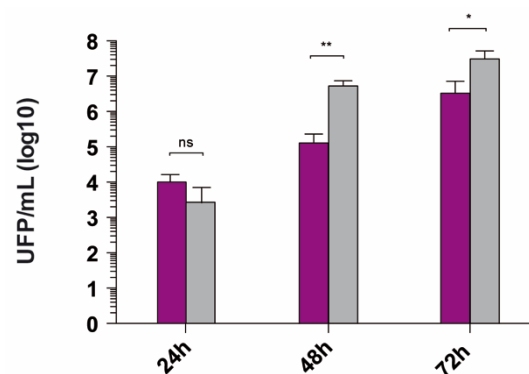


Figura 9. Fitness replicativo del virus de infecciones persistentes. Células DF-1 fueron infectadas (0,005 UFP/célula) con sobrenadantes de cultivos de DF-1P mantenidas 180 días (gris) o sobrenadantes de células DF-1 infectadas con virus WT (morado). Los sobrenadantes fueron recogidos a los tiempos post infección que aparecen en la figura. Cada una de las mediciones fue recogida de 3 experimentos diferentes. Los corchetes indican comparación por parejas. *, $p < 0,01$, **, $p < 0,001$, ns no significativo, se utilizó una prueba T de student de dos colas utilizando el método de corrección Holm-Sidak.

Por último, se llevó a cabo un análisis para determinar si las poblaciones virales procedentes de células infectadas persistentemente pudieran presentar una capacidad superior a la del virus parental para dar lugar a nuevas infecciones persistentes. Para ello, se siguió un protocolo similar al descrito en el apartado 1 de resultados para la generación de células persistentemente infectadas. En este caso, se llevaron a cabo infecciones de cultivos de células DF-1 con el virus parental o virus recogido a partir de células DF-1P empleando una MOI de 0'005 UFP/célula. Los cultivos fueron mantenidos durante 21 días. Tras ese periodo, los cultivos fueron fijados y teñidos con cristal violeta. El recuento del número de colonias celulares fue similar en ambos casos, lo que indica que el origen de la población viral empleada para la infección primaria no está relacionado con la capacidad de establecer nuevas infecciones persistentes.

2. Elementos celulares implicados en el establecimiento de la infección persistente causada por IBDV.

2.1 Eliminación de IBDV de células DF-1P.

Los datos descritos en el apartado anterior indicaban que el establecimiento de la persistencia no está relacionado con la selección de poblaciones de virus especialmente capacitadas para generar este tipo de infección. Esta observación abría la posibilidad de que la persistencia viral pudiera estar asociada a la existencia de subpoblaciones celulares capaces de sobrevivir a la fase de infección aguda.

Para analizar esta posibilidad, sería conveniente comparar la respuesta a la infección por IBDV de cultivos de células DF-1 originales y cultivos procedentes de células DF-1P.

Naturalmente, para poder realizar este estudio resultaba esencial eliminar completamente el virus presente en las células DF-1P. Para ello, se utilizó el reactivo 7-deaza-2'-C methyladenosine (7-DMA), un inhibidor muy eficiente de diferentes polimerasas virales entre las que se encuentra la de IBDV^{60,150}. Cultivos de células DF-1P se mantuvieron en medio de cultivo suplementado con 200 µM de 7-DMA durante un periodo de 90 días. Posterior al tratamiento, y como forma de asegurar la eliminación completa del virus, los cultivos fueron mantenidos en medio sin 7-DMA durante 30 días. Trascurrido este tiempo, los cultivos fueron analizadas mediante RT-qPCR, WB e IF. En todos los casos las células DF-1, DF-1P y DF-1 infectadas de forma aguda (MOI 1UFP/célula; 18 h pi) fueron utilizadas como control. Como podemos ver en la **Figura 10** tanto por RT-qPCR (A), como por WB (B) e IF (C) no se detecta la presencia de infección en las células tratadas con 7-DMA, lo cual indica la eficacia del tratamiento. Esta línea celular procedente de células DF-1P fue denominada DF-1P curada (DF-1PC).

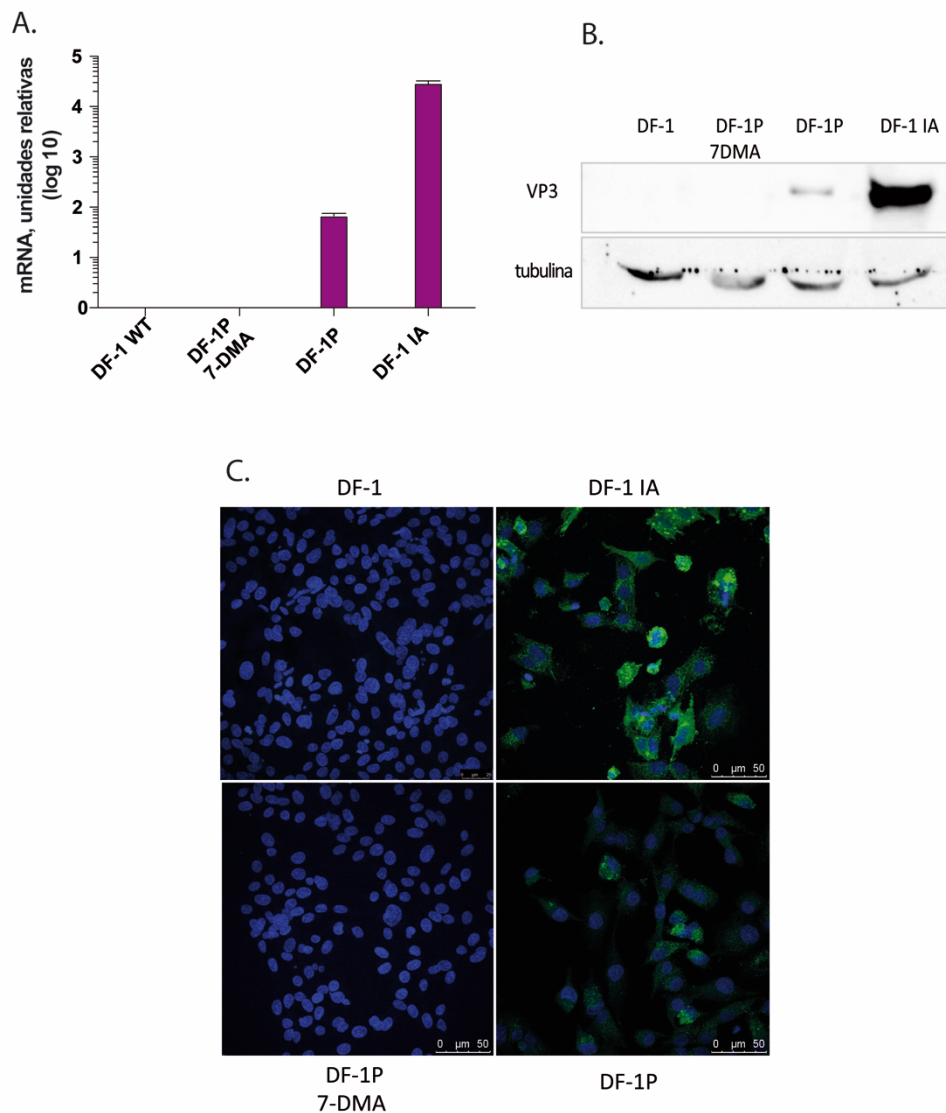


Figura 10. Eliminación del virus de las células DF-1P. Las células DF-1P fueron tratadas con el reactivo 7DMA. Las células DF-1P fueron mantenidas en cultivo con el reactivo durante 180 días y posteriormente fueron mantenidas en cultivo sin el reactivo durante 30 días para comprobar que no había reaparición de poblaciones supervivientes de virus. Tras este proceso células DF-1P y DF-1P tratadas con 7-DMA (DF-1P 7-DMA) fueron analizadas para comprobar la presencia de virus, células DF1 mock (DF1 WT) e infectadas de forma aguda (DF1 IA) fueron utilizadas como control. **A.** RNA extraído de las células procedentes de las diferentes condiciones fue sometido a RT-qPCR utilizando cebadores que hibridan en el segmento A de IBDV, en la región codificante para VP3. **B.** Las muestras fueron sometidas a un SDS-PAGE seguido de un WB utilizando anticuerpos contra la proteína viral VP3 y la celular tubulina. **C.** Células de todas las condiciones fueron fijadas y sometidas a un ensayo de IF utilizando anticuerpos contra la proteína viral VP3 y utilizando DAPI para teñir el DNA nuclear.

2.2 Las células DF-1PC muestran una tasa de supervivencia a la infección superior a la de la línea DF-1 parental.

En este punto, era importante comparar la replicación del virus en cultivos de células DF-1 y DF-1PC. Para ello, ambas líneas celulares se infectaron con IBDV. Se recogieron sobrenadantes de los cultivos infectados a diferentes tiempos p.i. (24, 48 y 72 h). Estas muestras fueron empleadas para determinar el título de virus mediante dilución límite. Como se muestra en la **Figura 11.A**, no se detectaron diferencias significativas en la cinética de liberación de virus extracelular entre ambas líneas celulares. Sin embargo, estos ensayos nos permitieron observar que la muerte celular provocada durante el proceso infectivo es mucho menor en cultivos de células DF-1PC que en la línea celular parental, DF-1. Para evaluar cuantitativamente esta fenómeno, se analizó la cinética de muerte celular empleando ensayos de MTT (ver M&M). Monocapas de células DF-1 y DF-1PC fueron infectadas con IBDV y la viabilidad celular fue evaluada en muestras recogidas a 1, 3 y 6 días p.i., respectivamente. Como se muestra en la **Figura 11.B**, la infección de células DF-1 provoca una rápida reducción de la viabilidad celular, alcanzando valores indetectables a los 3 días p.i. Por el contrario, la disminución de la viabilidad de las células DF-1PC infectadas es significativamente menos pronunciada, alcanzando su valor mínimo, de aproximadamente 35%, a los 3 días p.i. Por otra parte, los valores de MTT detectados en cultivos de DF-1PC infectados experimentaron un aumento significativo a los 6 días p.i. Esta última observación indica que las células que sobreviven la fase aguda de infección mantienen la capacidad de proliferar. En la **Figura 11.C** se muestran imágenes representativas, obtenidas mediante microscopía de contraste de fase, correspondientes a cultivos de células DF-1 y DF-1PC infectados. Estas imágenes fueron capturadas a 1 y 6 días p.i., respectivamente. En ellas, se evidencia la diferencia en la capacidad de ambas líneas celulares para sobrevivir a la fase aguda de infección por IBDV. Es importante reseñar que los cultivos de células DF-1PC infectados con IBDV se restablecen y regeneran monocapas celulares confluentes 8-10 días después del inicio de la infección.

Datos anteriores de nuestro laboratorio habían mostrado como la infección por IBDV provoca una potente respuesta apoptótica⁶⁰. En vista de los resultados descritos resultaba especialmente relevante comparar la apoptosis inducida por la replicación del virus en cultivos de células DF-1 y DF-1PC. Para ello se llevó a cabo un ensayo con el reactivo Caspase-Glo 3/7 a 18 horas p.i. La activación de las caspasas y, por tanto, inducción de apoptosis en células DF-1 es significativamente superior a la inducida en DF-1PC (**FIGURA 12**).

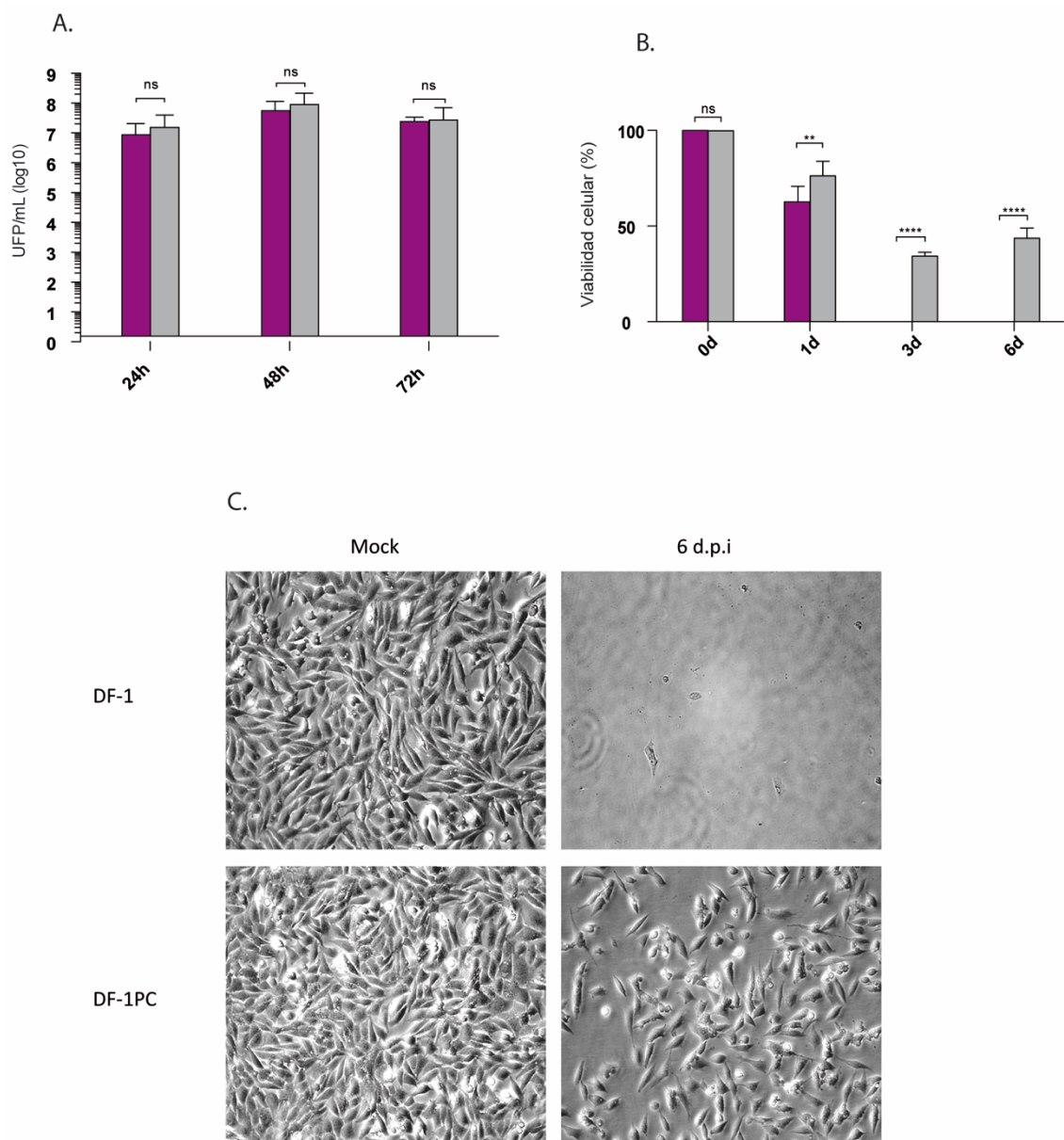


Figura 11. Comparación de la susceptibilidad y capacidad de supervivencia a una infección por IBDV entre células DF-1 y DF-1PC. Células DF-1 (morado) y DF-1PC (gris) se infectaron con IBDV WT (3 UFP/célula). **A.** Se recogieron muestras de sobrenadante a 24, 48 y 72 h.p.i. para realizar una titulación viral. Los datos corresponden a las medias de tres experimentos diferentes que marcan las líneas de desviación estándar. **B.** Se determinó la viabilidad celular por medio de un ensayo con el reactivo MTT a los tiempos p.i. que aparecen en la figura. **, $p < 0,001$, ****, $p < 0,00001$, ns no significativo, se utilizó una comparación ANOVA de dos direcciones. **C.** Obtención de imágenes de la monocapa celular infectada con objetivo 20X y contraste de fase a los tiempos indicados en la imagen.

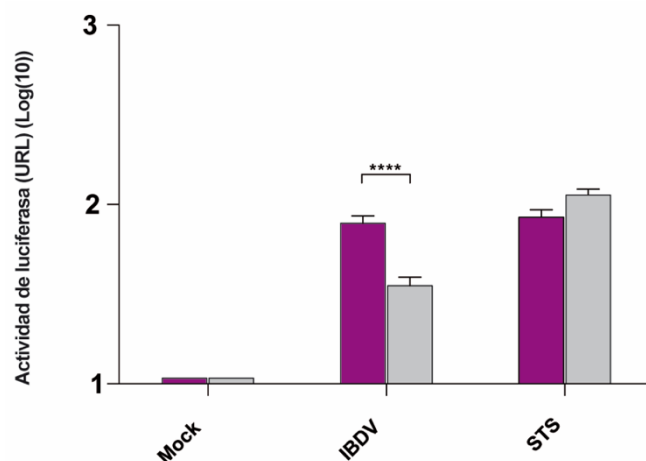


Figura 12. Análisis de la inducción de apoptosis tras la infección por IBDV en células DF-1 y DF-1PC. Células DF-1 (morado) y DF-1PC (gris) se infectaron con IBDV WT (3 UFP/células). Las células fueron tratadas con el kit Caspase-Glo 3/7 assay kits (Promega) para medir apoptosis celular a 18 h.p.i. ****, $p < 0,00001$, se utilizó una comparación ANOVA de dos direcciones.

2.3. La vía de señalización JAK-STAT está bloqueada funcionalmente en las células DF-1PC.

El IFN tipo I juega un papel crucial en el destino de las células infectadas con IBDV⁶⁰. Así, mientras que el pretratamiento con IFN- α induce una sólida protección frente a la infección su adición poco después del comienzo de la infección (1-3 h p.i.) provoca una respuesta apoptótica masiva que acaba con los cultivos infectados⁶⁰. Por tanto, era importante comparar la capacidad de las células DF-1 y DF-1PC para responder al tratamiento con IFN de tipo I.

Para ello, empleamos una aproximación experimental basada en el empleo de una versión recombinante del virus de la estomatitis vesicular (VSV) que expresa de forma constitutiva la proteína verde fluorescente denominado VSV-GFP. VSV es un virus extremadamente sensible a la respuesta antiviral inducida por IFN de tipo I. Esta propiedad permite evaluar de forma directa la capacidad de respuesta a IFN en líneas celulares susceptibles a la infección por este virus.

Cultivos de ambas líneas celulares, DF-1 y DF-1PC, fueron tratados durante 16 h con medio de cultivo o con medio suplementado con IFN- α (1.000 UI/ml). A continuación, los cultivos fueron infectados (1 UFP/célula) con VSV-GFP. A las 12 h p.i., las células se incubaron en presencia de DAPI para teñir los núcleos celulares y posteriormente fueron visualizadas mediante microscopía de fluorescencia para detectar la expresión de la proteína GFP. Como era de esperar, las células DF-1 no tratadas mostraron una intensa señal de GFP, lo que indica que habían sido infectadas eficientemente, mientras que las células tratadas con IFN estaban completamente protegidas frente a la infección, como lo demuestra la ausencia de señal fluorescente (**Figura 13.A**). Con los

cultivos de células DF-1PC se observó una diferencia significativa. En este caso, tanto los cultivos tratados como los no tratados fueron eficientemente infectados con VSV-GFP lo que evidencia la incapacidad de las células DF-1PC para responder a IFN- α .

Este mismo experimento se realizó en las células DF-1P para comprobar si la ausencia de respuesta a IFN está presente en las células persistentes o aparece tras la curación del virus. Como se observa en la **figura 13.B** las células DF-1P se comportan exactamente igual que las DF-1PC.

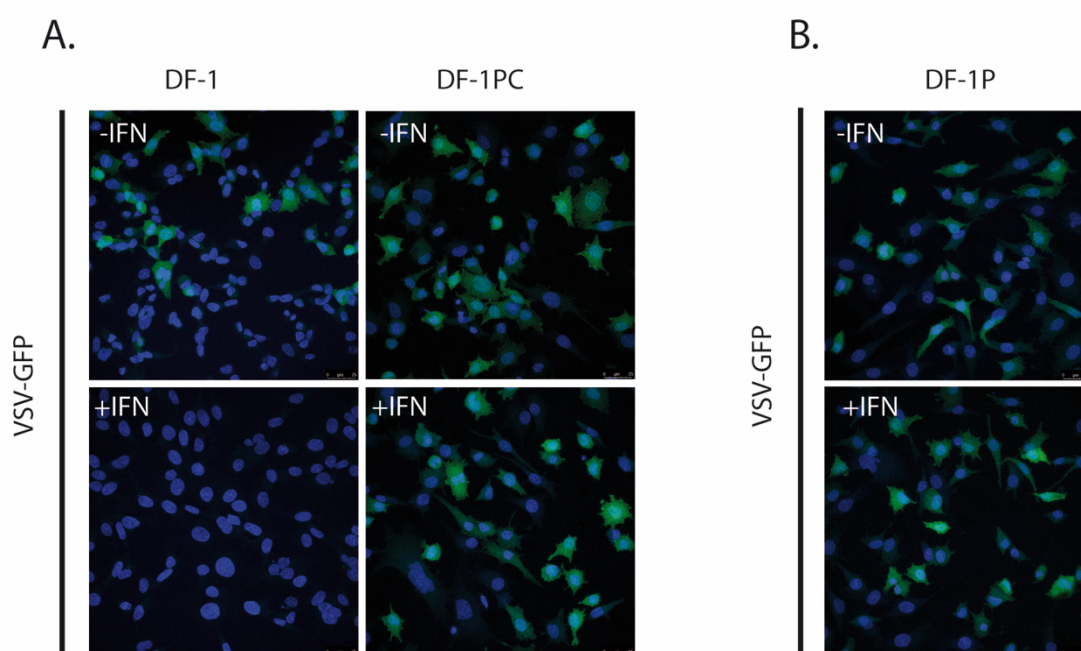


Figura 13. Análisis de la capacidad de respuesta a IFN- α de células DF-1 y DF-1PC. A. Células DF-1 y DF-1PC fueron tratadas con IFN- α (-IFN o +IFN) y 18 h después infectadas con VSV-GFP (1 UFP/célula). IF en la que se han teñido los núcleos con DAPI. B. Células DF-1P fueron tratadas con IFN- α (-IFN o +IFN) e infectadas 16h después con VSV-GFP (1 UFP/célula). IF en la que se han teñido los núcleos con DAPI.

Para verificar este hallazgo se empleó una aproximación alternativa basada en la determinación mediante RT-qPCR de la activación transcripcional de genes de respuesta a IFN de tipo I denominados genéricamente genes estimulados por interferón (ISG). En concreto, se caracterizó la expresión de los genes que codifican las proteínas Mx y OAS, habitualmente empleados como marcadores de la activación de la vía de señalización JAK-STAT⁶⁹. Como se muestra en la **Figura 14**, las células DF-1 respondieron de manera eficiente al tratamiento con IFN- α , desencadenando una fuerte activación transcripcional de ambos genes. Por el contrario,

en las muestras correspondientes a células DF-1PC no se observó este efecto, detectándose niveles imperceptibles de transcritos correspondientes a ambos genes, tanto en cultivos tratados o no tratados con IFN- α . Estos resultados confirmaron la incapacidad de la línea celular DF-1PC para responder a IFN- α .

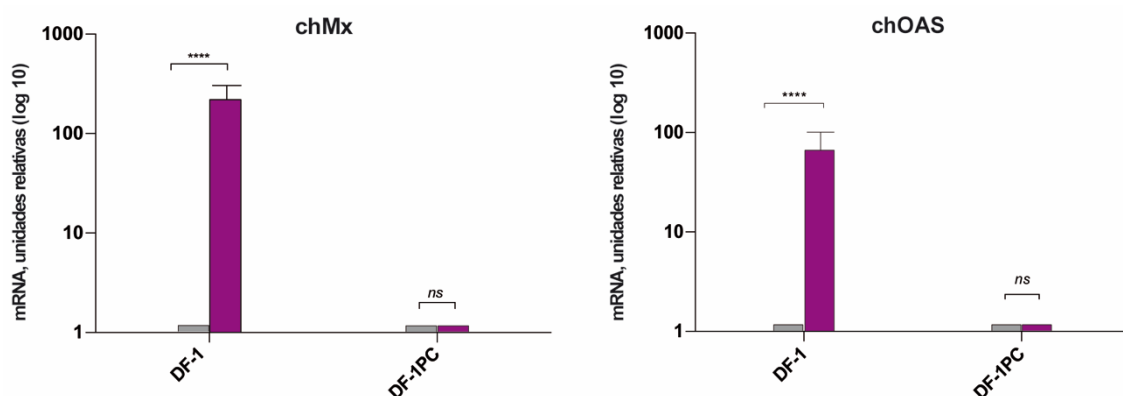


Figura 14. Análisis de la expresión de ISGs en células DF-1 y DF-1PC. Células DF-1 y DF-1PC fueron tratadas (morado) o no tratadas (gris) con IFN- α . 18 horas post tratamiento se realizó extracción de RNA y se realizó una RT-qPCR con cebadores que hibridan en el genoma de las ISG indicada en la imagen. ****, $p < 0,0001$, ns no significativo, se utilizó una comparación ANOVA de dos direcciones.

2.4. Las células DF-1PC expresan una versión no funcional del receptor de IFN de tipo 1.

Los resultados obtenidos indicaban la existencia de algún defecto(s) que impiden el correcto funcionamiento de la ruta de señalización JAK-STAT en células DF1-PC. Esta ruta es relativamente simple e involucra un número reducido de componentes proteicos¹⁵¹. A pesar de su aparente simplicidad, el número de mutaciones potencialmente capaces de afectar a la funcionalidad de la vía es muy elevado. Por ello, decidimos obtener la secuencia nucleotídica del genoma de las células DF-1PC, así como de la línea parental DF-1 mediante la secuenciación masiva descrita (ver M&M).

Las secuencias correspondientes a DF-1 y DF-1PC fueron ensambladas y comparadas con el genoma de referencia (*Gallus Gallus*; raza Red Jungle Fowl; aislado RJF número 256 [acceso GRCg6a]). Las secuencias obtenidas para ambos genomas cubrían más del 98% del genoma de referencia con una profundidad de secuencia promedio en ambos casos superior a 35. El valor de la calidad con respecto a distribución de las lecturas es de en torno a 35, este valor indica la calidad en la distribución de la secuenciación.

Con el fin de localizar posibles polimorfismos, inserciones y/o deleciones diferenciales, se llevó a cabo un análisis comparativo de los exomas de ambas líneas con respecto al exoma de referencia. No se observó la presencia de inserciones o deleciones que diferenciaran ambos exomas. Sin embargo, este análisis condujo a la detección de dos mutaciones puntuales (*single nucleotide polymorphisms*, SNP) presentes exclusivamente en el exoma de las células DF-1PC. Ambas mutaciones, consistentes en la substitución de un residuo de timidina (T) por guanina (G), se localizan en las posiciones 106.590.841 (SNP1) y 106.591.114 (SNP2), respectivamente, del genoma de referencia. Como se muestra en la **tabla 4**, las mutaciones SNP1 y SNP2 se detectaron en el 57 y 46%, respectivamente, del total de lecturas que cubrían ambas regiones del genoma de las células DF-1PC.

Ambas mutaciones se localizan en el cromosoma 1 (Referencia de secuencia del NCBI NC_006088.5), dentro del último exón (exón 10) de la secuencia correspondiente al gen que codifica la subunidad 2 del receptor de IFN (IFNAR-2) (Número asociado en GenBank AF082665.1).

Tabla 4. SNPs encontrados en los exomas de DF-1PC por secuenciación de DNA.

Exoma	Posición nucleotídica ₁	Referencia ₂	Lecturas ₃	G conteo ₄	T conteo ₄	Frecuencia SNP (%)
DF-1	106,590,841	G	30	30	0	0
DF-1PC	106,590,841	G	21	9	21	57
DF-1	106,591,114	G	32	32	0	0
DF-1PC	106,591,114	G	32	17	15	46

1. Posición nucleotídica: posición (pb) de los SNPs detectados en DF1 en referencia al genoma de *Gallus Gallus*.
2. Referencia: Nucleótido encontrado en el genoma de referencia de *Gallus Gallus* en las posiciones indicadas.
3. Lecturas: número de lecturas de secuenciación que abarcan la posición del nucleótido indicada dentro del exoma del genoma ensamblado
4. Conteo G/T: número de lecturas de secuenciación que albergan los nucleótidos G o T dentro de los exomas ensamblados en la posición nucleotídica indicada del genoma de *Gallus Gallus* de referencia

Para confirmar los resultados obtenidos mediante NGS, se diseñaron dos cebadores que permiten amplificar mediante PCR una región de 701 pb del gen IFNAR2 donde se localizan ambas mutaciones. Las reacciones de PCR se realizaron empleando como molde DNA total purificado a

partir de células DF-1 y DF-1PC, respectivamente. Los cebadores utilizados fueron OL_IFNAR2 (FW y RV), que hibridan en las posiciones 660 a 688 y 1349 a 1368 de la secuencia del gen IFNAR-2. Los fragmentos de DNA generados fueron purificados y secuenciados utilizando los mismos cebadores empleados en las reacciones de PCR. Los resultados de la secuenciación del amplicón correspondiente al DNA de células DF-1PC, muestran la presencia de una mezcla de nucleótidos T y G en las posiciones correspondientes a las mutaciones SNP1 Y 2 detectadas mediante NGS. Como era de esperar, estas ambigüedades de secuencia no fueron observadas en las muestras correspondiente al genoma de línea parental DF-1, detectándose en ambas posiciones únicamente residuos G. (Figura 15).

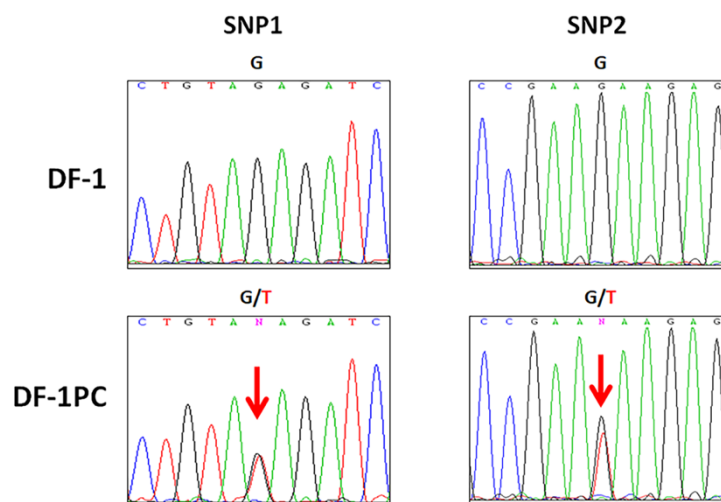


Figura 15. Detección de un polimorfismo en un único nucleótido del exón 10 de IFNAR-2. El DNA aislado de cultivos celulares de DF-1 y DF-1PC fue sometido a PCRs utilizando los oligonucleótidos OL_IFNAR2 (FW y RV). Los amplicones resultantes, que contenían la región de interés del exón 10 de IFNAR2, fueron sometidos a secuenciación Sanger utilizando los mismos oligonucleótidos. Los paneles muestran cromatogramas de las regiones de interés secuenciadas de DF-1 y DF-1PC amplificadas. Las letras que aparecen en el cromatograma corresponde con los nucleótidos detectados, A (verde), C (azul), G (negro) y T (rojo). Las ambigüedades de la secuencia (G/T) están indicadas como una N (magenta).

A continuación, se realizó un análisis para determinar si las mutaciones identificadas eran homo- o heterocigóticas, es decir, si están presentes o no en el mismo alelo. Para ello se llevó a cabo una reacción de PCR empleando DNA extraído de células DF-1PC y los cebadores OL_IFNAR2. El producto de PCR fue purificado y posteriormente clonado en el plásmido pGEM-T Easy siguiendo el protocolo descrito en M&M. Posteriormente, se procedió a purificar plásmidos pGEM-T Easy recombinantes a partir de 20 colonias bacterianas independientes resistente a

ampicilina. Los plásmidos purificados fueron secuenciados utilizando los cebadores descritos anteriormente. Como se recoge en la **tabla 5** todos los plásmidos analizados contenían mutaciones únicas. Nueve de ellos albergaban la mutación SNP1 y los once restantes la mutación SNP2. Estos resultados permiten concluir que ambas mutaciones son heterocigotas y se localiza en diferentes alelos del gen IFNAR-2.

Por último, con el objetivo de determinar si las mutaciones detectadas en el genoma de las células DF-1PC se encuentran también presentes en las células DF-1P, utilizando la estrategia experimental descrita, se procedió a analizar la secuencia nucleotídica de la región de interés del gen IFNAR-2 en amplicones generados a partir de DNA genómico de esta línea celular. El resultado de este análisis confirmó que el genoma de las células DF-1P contiene ambas mutaciones. Esta observación sugiere que las mutaciones se encuentran en el genoma de una subpoblación minoritaria de la línea parental DF-1. Alternativamente, se podría especular con la posibilidad de que ambas mutaciones aparecieran durante el proceso de establecimiento de la infección persistente.

Tabla 5. SNPs localizados tras la secuenciación de colonias transfectadas con el plásmido pGEM-t Easy al que se le ha incorporado el fragmento de la secuencia que contiene los dos SNPs localizados por secuenciación de DNA de DF-1PC.

Nº de Colonia	SNP-1	SNP-2
Colonia 1	+	-
Colonia 2	+	-
Colonia 3	-	+
Colonia 4	+	-
Colonia 5	-	+
Colonia 6	-	+
Colonia 7	-	+
Colonia 8	+	-
Colonia 9	+	-
Colonia 10	+	-
Colonia 11	-	+
Colonia 12	-	+

Colonia 13	+	-
Colonia 14	+	-
Colonia 15	-	+
Colonia 16	-	+
Colonia 17	-	+
Colonia 18	+	-
Colonia 19	-	+
Colonia 20	-	+

2.5. Las mutaciones en la región C-terminal del gen IFNAR-2 inactivan la ruta de señalización JAK-STAT.

El gen IFNAR2 codifica un polipéptido precursor (508 residuos) que contiene un péptido señal que es procesado durante el transporte a la membrana celular. En su forma madura IFNAR2 es una proteína transmembrana de tipo I que contiene un ectodominio N-terminal (216 residuos), una región transmembrana (20 residuos) y un dominio citoplasmático (246 residuos). La región extracelular de la proteína es responsable de la interacción con IFNs de tipo I y la formación subsiguiente de un complejo terciario con el ectodominio de la subunidad 1 del receptor de IFN (IFNAR1). Una vez ensamblado el complejo, las regiones citoplasmáticas de IFNAR1 e IFNAR2 son responsables de iniciar el proceso de señalización interaccionando y activando las proteínas efectoras JAK, STAT y TYK2 ¹⁵².

Las mutaciones SNP1 y SNP2 detectadas en el genoma de la línea celular DF-1PC son dos sustituciones G->T. Los codones originales GAT y GAA, codifican residuos de ácido glutámico (E), E301 y E392, respectivamente. Las sustituciones descritas provocan la formación de dos nuevos codones de terminación de la traducción, TAT y TAA, respectivamente. Como consecuencia, los genes IFNAR2 correspondientes a ambos alelos del genoma de las células DF-1P y DF-1PC codifican versiones truncadas de la proteína que carecen de 208 y 107 residuos, respectivamente. Ambas deleciones afectan a la región C-terminal de la proteína que contiene el dominio citoplasmático responsable de la activación de la cascada de señalización JAK-STAT (**Figura 16**). La ablación de este dominio funcional explica la incapacidad de ambas líneas celulares para responder a IFN de tipo I.

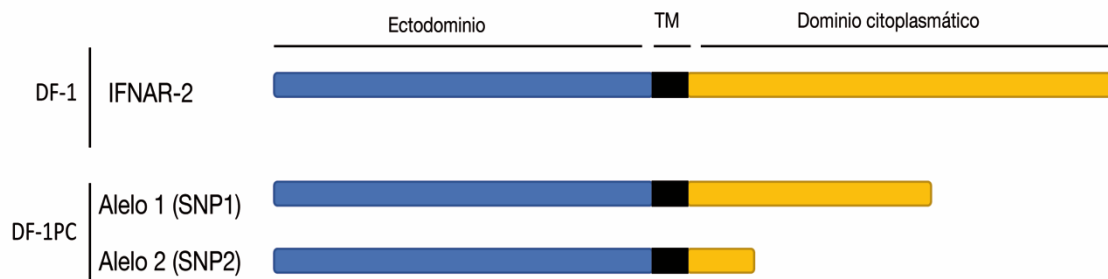


Figura 16. Esquema comparativo de la expresión de la proteína IFNAR-2 completa (DF-1) y truncada (DF-1PC). La proteína IFNAR-2 de células DF-1PC presenta dos mutaciones puntuales que producen un cambio de guanina a timidina, se encuentran en los codones GAT y GAA, ambos codificantes para glutámico (E), E301 y E392. Los cambios producen dos codones TAT y TAA, ambos codones stop. La proteína resultante tiene truncado el extremo C-terminal, al cual le faltan 107 o 208 residuos.

Con el fin de confirmar la existencia de una relación directa entre las mutaciones detectadas y el bloqueo de la capacidad de respuesta a IFN de las células DF-1PC, llevamos a cabo un experimento de recuperación de la función. Para ello se generó el plásmido pCI-Neo-chIFNAR2-FLAG, derivado del vector de expresión pCI-Neo, que contiene el gen IFNAR-2 fusionado al epítipo FLAG bajo el control transcripcional del promotor inmediatamente temprano de citomegalovirus (CMV). Cultivos de células DF-1PC fueron transfectados con el plásmido pCI-Neo-chIFNAR1-FLAG o pCI-Neo vacío. A las 24 h post-transfección, los cultivos fueron tratados con IFN- α y mantenidos durante 16 h. Tras este periodo los cultivos fueron recogidos y empleados para purificar RNA. Estas muestras de RNA fueron utilizadas para cuantificar mediante RT-qPCR la expresión de los genes de respuesta a IFN Mx y OAS descritos anteriormente. Como controles para estos ensayos se emplearon muestras de RNA extraídas a partir de cultivos de células DF-1 tratados y no tratados con IFN- α .

Los resultados obtenidos (**Figura 17**) demuestran que la transfección con el vector pCI-Neo-chIFNAR2-FLAG provoca la recuperación de la capacidad de respuesta a IFN lo que se traduce en un incremento significativo de transcripción de ambos ISG analizados. Estos resultados nos permiten concluir de forma taxativa que el bloqueo de la ruta de señalización JAK-STAT detectado en la línea celular DF-1PC se debe exclusivamente a la presencia de las mutaciones en el gen IFNAR2 descritas anteriormente.

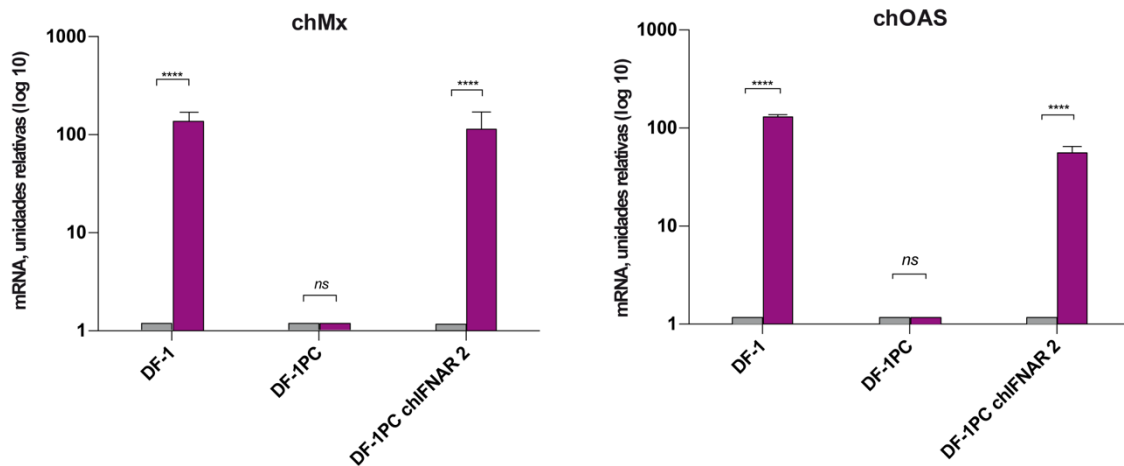


Figura 17. Recuperación de la expresión de IFNAR-2 en células DF-1PC. Células DF-1PC fueron transfectadas con el plásmido pCI-neo/chIFNAR2-FLAG (DF-1PC chIFNAR2). Las células DF-1PC control fueron transfectadas con el vector vacío pCI-neo (DF-1PC). A. A las 24 horas post transfección las células fueron tratadas (morado) o no (gris) con IFN- α , se mantuvo el tratamiento durante 16 h. Células DF-1 fueron utilizadas como control para el experimento. RNA purificado de todas las condiciones fue analizado por RT-qPCR comprobando la activación transcripcional de Mx y OAS.

2.6. Efecto de la inactivación de la ruta JAK-STAT sobre la respuesta a la infección por IBDV de células HeLa.

Los datos anteriores demuestran que el bloqueo de la vía de señalización JAK-STAT reduce significativamente la tasa de muerte celular inducida por la infección con IBDV en células aviares DF-1. Así como que este efecto está acompañado por un incremento significativo de la capacidad para el establecimiento de infecciones persistentes por IBDV.

En este punto, era importante determinar si este es un rasgo general que opera en otras líneas celulares susceptibles a la infección por IBDV o si, por el contrario, se trata de un fenómeno particular únicamente aplicable a células DF-1.

La realización de este estudio fue posible gracias a la utilización de la línea HeLa IFNAR-2 KO cedida amablemente por el Prof. Gideon Schreiber (Weizmann Institute of Science. (Israel)) cuyo grupo de investigación ha desarrollado recientemente, mediante CRISP-CAS9, una colección de líneas celulares derivadas de células HeLa que carecen de forma selectiva de cada uno de los genes participantes en la ruta JAK-STAT.

La línea HeLa IFNAR2 KO, carece del gen IFNAR2 y consecuentemente es incapaz de responder a IFN tipo I. Antes de comenzar con los experimentos se realizó un ensayo preliminar que consistió en tratar células HeLa IFNAR2 KO con INF- α , 18 horas después extractos de RNA fueron sometido a una RT-qPCR para medir la expresión de Mx. Como era de esperar, los niveles de esta ISG son inexistentes (**Figura 18**).

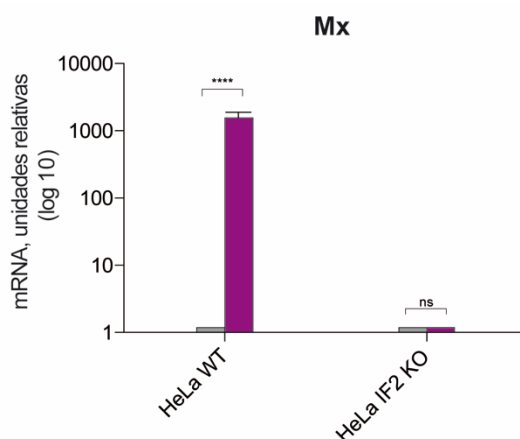


Figura 18. Efecto de la inactivación de la ruta JAK-STAT en células HeLa. Células HeLa WT y células HeLa IFNAR2 KO fueron tratadas (morado) o no (gris) con IFN- α durante 16 h. Se realizó extracción de RNA y análisis de la expresión de Mx por RT-qPCR. Las desviaciones estándar corresponden a 3 experimentos diferentes y los corchetes indican comparación entre parejas. ****, $p < 0,00001$, ns no significativo, se utilizó una comparación ANOVA de dos direcciones.

Tras este ensayo de confirmación, se comparó la tasa de muerte inducida por la infección por IBDV en cultivos de células IFNAR2 KO y en células parentales (WT) capaces, de responder a IFN de tipo I, utilizando el ensayo de viabilidad celular MTT. Para ello, se infectaron monocapas celulares, y se determinó la viabilidad celular a 1, 3 y 6 días p.i. Como se muestra en la **figura 19.A**, el comportamiento de ambas líneas celulares fue sorprendentemente diferente. Las células WT fueron eliminadas rápidamente por la infección, alcanzando valores de viabilidad cercanos al 0% a los 6 días p.i. Por el contrario, la viabilidad de células IFNAR2 KO infectadas permaneció prácticamente inalterada durante la fase inicial del experimento (1 a 3 días p.i.) y se incrementó en tiempos posteriores. De acuerdo con esta observación, las células IFNAR2 KO infectadas mantienen su capacidad de proliferación.

La segunda aproximación realizada consistió en medir la cantidad de virus infeccioso en el sobrenadante, para ello se infectaron células HeLa y HeLa IFNAR2 KO y se recogieron muestras a

24, 48 y 72 h.p.i. Los títulos virales indican que a 48 y 72 horas p.i. IBDV produce más progenie infectiva en células HeLa IFNAR2 KO (Figura 19.B).

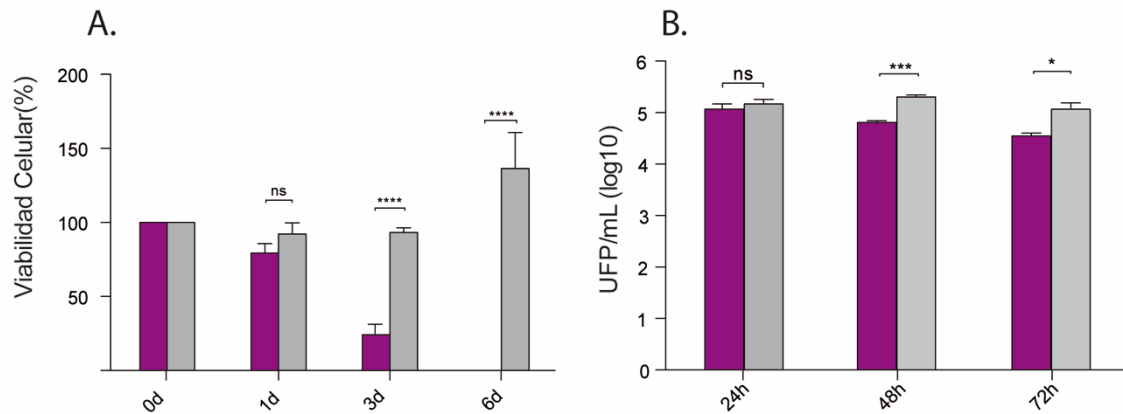


Figura 19. Efecto de la inactivación de la ruta JAK-STAT en células HeLa infectadas por IBDV. A. Células HeLa WT y HeLa IFNAR-2 KO fueron infectadas con IBDV (3UFP/célula) y sometidas a un ensayo con MTT a los tiempos p.i. que aparecen en la figura. Los valores de MTT obtenidos en células Mock en el momento de la infección son los considerados 100% de viabilidad celular. Los datos corresponden con las desviaciones estándar de 3 experimentos diferentes, los corchetes indican comparación entre parejas. ****, $p < 0,00001$, se utilizó una comparación ANOVA de dos direcciones. **B.** Ambas líneas celulares fueron infectadas con IBDV (3 UFP/célula) y fueron recogidas muestras de sobrenadante a las h. p.i. indicadas en la figura. Estas muestras fueron sometidas a titulación por dilución límite. Las barras de error corresponden a tres experimentos diferentes, los corchetes indican comparación entre parejas. *, $p < 0,01$, ***, $p < 0,0001$, se utilizó una comparación ANOVA de dos direcciones.

Es importante resaltar que las células IFNAR2 KO infectadas de forma aguda desarrollan infecciones persistentes con enorme facilidad. Células HeLa IFNAR2 KO fueron infectadas y mantenidas en cultivo 20 días cambiando el medio cada 5, transcurrido este tiempo las células fueron sometidas a una IF que confirma la presencia de virus persistente (FIGURA 20). Como se muestra en la Figura 20, al igual que lo observado en células DF-1P persistentemente infectadas, las células IFNAR2 KO infectadas persistentemente también muestran una acumulación muy reducida de proteínas codificadas por el virus.

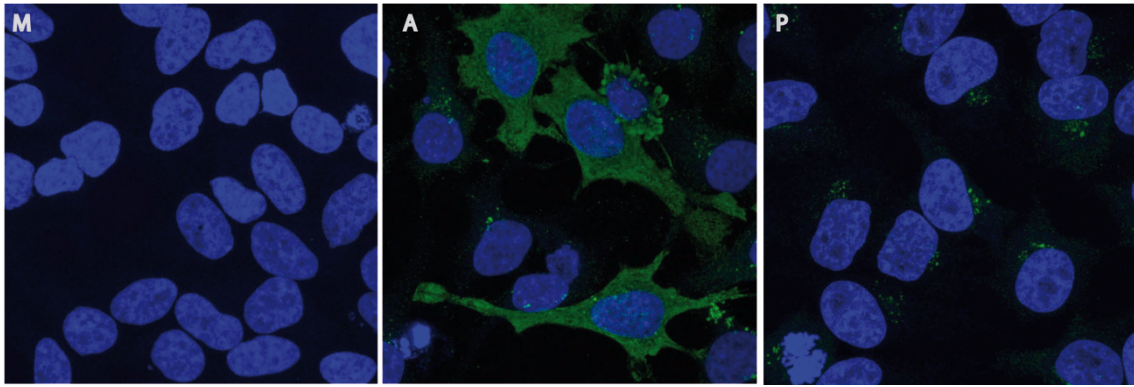


Figura 20. Establecimiento de infecciones persistentes de células HeLa IFNAR2 KO. Células HeLa IFNAR2 KO persistentemente infectadas fueron mantenidas en cultivo durante 20 días y después fueron sometidas a un ensayo de IF utilizando anticuerpos específicos que reconocen la proteína estructural viral VP3. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Células no infectadas (Mock, M) e infectadas de forma aguda (MOI 3 UFP/célula) (A) fueron utilizadas como controles.

Con el fin de evaluar con mayor detalle el comportamiento diferencial de las células HeLa WT e IFNAR2 KO, se realizó un análisis mediante Western blotting (WB) de la expresión de la proteína viral VP3 y de las proteínas celulares Mx y PARP. Para ello, se utilizaron extractos celulares de células HeLa WT e IFNAR2 KO infectadas recogidos a 24, 48 y 72 h p.i. Como controles, se emplearon extractos de células infectadas de forma aguda. Como se muestra en la **Figura 21**, tanto las células WT como las IFNAR2 KO se infectan con IBDV, mostrando niveles similares de acumulación de la proteína VP3 a las 24 h p.i. En línea con los datos de viabilidad celular mostrados anteriormente, la muerte de células WT provoca una disminución significativa de la señal correspondiente a la proteína VP3 a 48 y 72 h p.i. Como era de esperar, esta disminución no se aprecia en los extractos correspondientes a células IFNAR2 KO. Por otra parte, se puede observar cómo la infección de células WT desencadena una robusta activación de la expresión de la proteína de respuesta a IFN de tipo 1 Mx a partir de las 48 h p.i. Por el contrario, y como era esperable, no se detectó la presencia de proteína Mx en extractos de células IFNAR2 KO infectadas lo que confirma la incapacidad de esta línea para activar la vía de señalización JAK-STAT en respuesta a la infección por IBDV. Finalmente, decidimos analizar en ambas líneas la inducción de apoptosis en respuesta a la infección por IBDV. Para este análisis decidimos monitorizar el efecto de la infección sobre la integridad de la polimerasa poli (ADP-ribosa) (PARP), una proteína nuclear que cataliza la reparación del ADN. Durante el inicio del proceso de muerte celular programada, esta proteína sufre un procesamiento proteolítico. La escisión de PARP es

comúnmente empleada como marcador temprano de apoptosis ¹⁵³. Como era de esperar, la infección de las células WT provocó un claro procesamiento de la proteína PARP, detectable a partir de las 24 h p.i. Este efecto fue significativamente atenuado en células IFNAR2 KO (Figura 21).

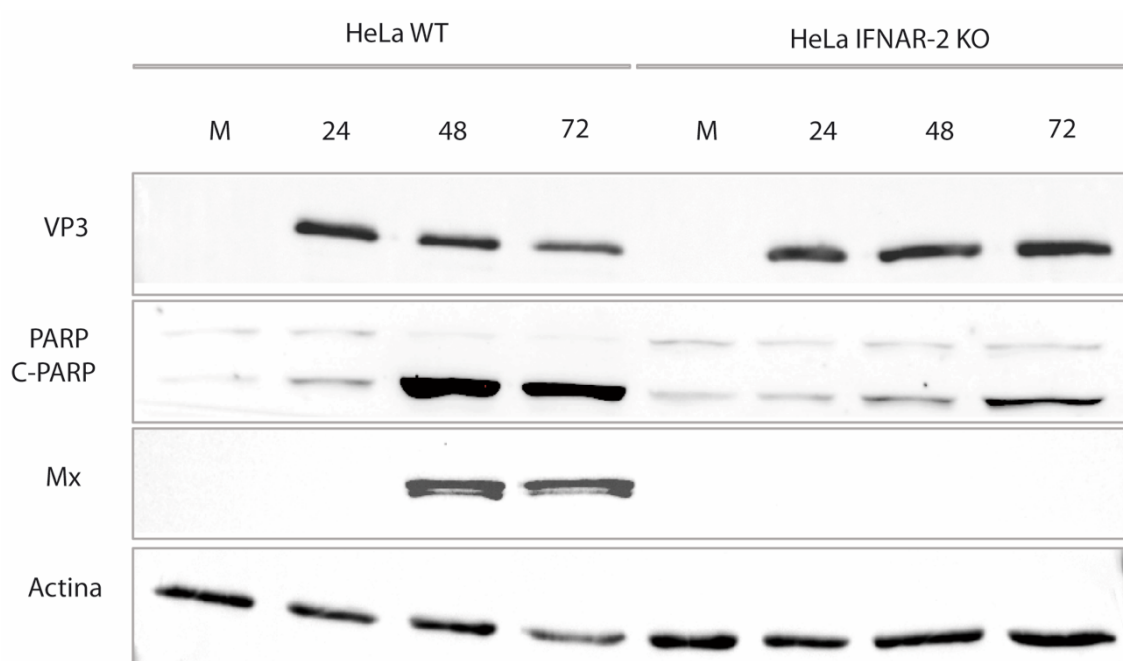


Figura 21. Análisis proteico de la infección por IBDV en células HeLa IFNAR-2 KO. Células HeLa WT y HeLa IFNAR-2 KO fueron infectadas por IBDV (3 UFP/célula), fueron recogidas muestras de las células sin infectar (Mock, M) como control y de células infectadas a los tiempos en h.p.i que aparecen en la figura. Fueron sometidas a un SDS-PAGE y posterior WB utilizando anticuerpos contra la proteína viral VP3, y las proteínas celulares Mx, PARP y proteínas de actina. El producto procesamiento de PARP (cleavage) ha sido denominado c-PARP.

En conjunto, estos resultados muestran que, de manera similar a lo que se había encontrado en células DF-1, la inactivación de la vía de señalización JAK-STAT mejora significativamente la capacidad de las células para sobrevivir a la fase aguda de infección y facilita el establecimiento de infecciones persistentes por IBDV.

3. Elementos virales influyentes en el establecimiento de infecciones persistentes por parte de IBDV.

Los resultados hasta ahora mencionados arrojan luz sobre cómo se establece la infección persistente de IBDV en cultivo celular. La ruta de señalización del IFN y, concretamente, la cascada de señalización de la ruta JAK-STAT, tienen un papel crucial en el desarrollo de la infección, y su

defecto conlleva una metamorfosis del proceso infectivo que lleva a una mayor facilidad para el establecimiento de infecciones persistentes. Sin embargo, hay ciertas curiosidades o características en las infecciones causadas por IBDV que requieren de un estudio más exhaustivo.

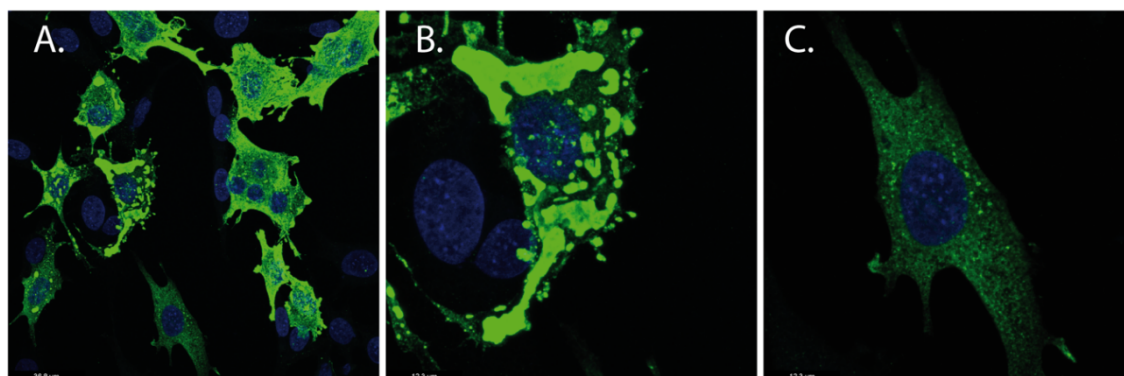
Estudios realizados en otros virus han llevado a la conclusión de que la replicación de numerosos virus RNA produce DVGs, y que su aparición está relacionada con interferencia con la replicación viral y activación de señales antivirales, además de, con el establecimiento de infecciones persistentes. Dadas las características de la infección comentadas a continuación, y la similitud de ellas con las causadas por los DVGs en otros virus, decidimos estudiar si estos genomas se generan durante la infección por IBDV.

3.1 Heterogeneidad fenotípica célula-célula en las infecciones de IBDV en cultivo celular.

Los años de exhaustivo estudio de IBDV en el laboratorio han permitido la observación de la infección desde diversos ángulos y con diferentes técnicas de biología molecular. Durante el estudio de las diferentes estructuras creadas en la célula durante la infección por IBDV, utilizando la técnica de IF, se advirtieron variaciones en la acumulación y distribución de las proteínas virales entre las diferentes células formadoras de la monocapa. Un comportamiento similar se ha observado en el caso del virus de Sendai (familia *paramyxovirus*) y, en este caso, la heterogeneidad en la distribución proteica viral entre las células es dependiente de la interacción de los DVGs con la maquinaria celular¹³⁷. Estos datos nos condujeron hacia el estudio de la posible aparición de este fenómeno en las infecciones por IBDV.

Con el objetivo de retratar la heterogeneidad célula-célula observada se realizaron infecciones con IBDV de dos líneas celulares diferentes: QM7 y DF-1. Estas células fueron sometidas a un ensayo de IF contra la proteína viral VP3 18 horas p.i. Las imágenes muestran los diferentes fenotipos que aparecen dentro de la infección, tanto en células DF-1 como QM7 (**Figura 22.A y figura 22.D**, respectivamente). Ciertas células se encuentran en un estadio avanzado de la infección en el que la acumulación de proteínas y formación de factorías virales están en su punto álgido (**Figura 22.B y figura 22.E**). Asimismo, y al lado de las células con mayor producción viral, aparecen otras en las que la expresión proteica esta desfavorecida, no se aprecian factorías virales y el fenotipo observado es punteado (**Figura 22.C y figura 22.F**). Las células con un fenotipo punteado y menor expresión de proteínas virales presentan un fenotipo similar al observado en células DF-1P y HeLa-P (**Figura 7.A y figura 20**). La similitud en el fenotipo podría ser un indicativo de estadio temprano de la infección persistente.

DF-1



QM7

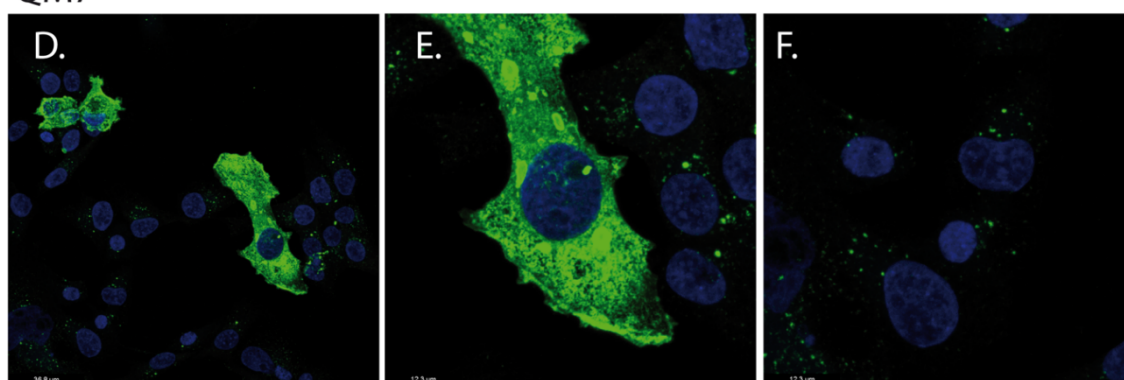


Figura 22. Heterogeneidad fenotípica célula-célula en células DF-1 y QM7 tras una infección por IBDV. Infección de monocapas celulares con MOI 3 UFP/célula de IBDV y sometidas a IF contra la proteína viral VP3 18 h.p.i. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. **A.** IF de células DF-1 infectadas con objetivo 63X de aceite. **B.** Zoom (4X) de células DF-1 infectadas con alta expresión viral. **C.** Zoom (4X) de células DF-1 infectadas con baja expresión viral. **D.** IF de células QM7 con objetivo 63X de aceite. **E.** Zoom (4X) de células QM7 infectadas con alta expresión viral. **F.** Zoom (4X) de células QM7 infectadas con baja expresión viral.

3.2 Las células DF-1P presentan diferente susceptibilidad a ser infectadas por IBDV u otros virus RNA.

Con el objetivo de caracterizar las células DF-1P, se realizaron ensayos de re-infección con IBDV, estos ensayos permitieron descubrir que las células DF-1P no pueden ser infectadas de nuevo por IBDV. Este fenómeno llamó nuestra atención y se decidió estudiar las posibles causas que lo producían. Conforme a hipótesis descritas en la bibliografía, y en relación a la contribución de los DVGs en el establecimiento de infecciones persistentes: durante una infección persistente se obtiene un equilibrio entre producción de DVGs y de genomas completos y, por lo tanto, de

virus infeccioso. El porcentaje de DVGs en estas células es superior al encontrado en una infección aguda, su mayor facilidad replicativa, asociada a su menor tamaño, hace que tengan ventaja con respecto a los segmentos estándar ¹⁵⁴. Si dentro del cultivo celular encontramos un equilibrio entre DVGs y virus infeccioso, la adición de nuevo virus, independientemente de la cepa de procedencia, no debería suponer una alteración del mismo. La elevada cantidad de DVGs competiría por la maquinaria replicativa del nuevo virus, maquinaria que tiene una elevada tasa de conservación entre cepas, y este no sería capaz de prosperar. Considerando ésta hipótesis cierta, decidimos realizar una aproximación experimental consistente en realizar infecciones con diferentes cepas de IBDV en células DF-1P, de esta manera descartamos que la incapacidad de infección de IBDV sea debida a una exclusión de virus idéntico al ya existente en la infección persistente. Para el desarrollo del ensayo se utilizaron la cepa Soroa (cepa con la que se ha conseguido el establecimiento de la persistencia), cepa P2 y cepa Bursine de IBDV, además células DF-1 y DF-1PC fueron utilizadas como control.

Extractos proteicos obtenidos 18 horas p.i. fueron sometidos a SDS-PAGE seguido de un WB contra la proteína viral VP3. Como era de esperar, tanto en células DF-1 como DF-1PC todas las cepas virales son capaces de producir una infección prospera. Por el contrario, y de la mano de nuestra hipótesis, ninguna de las cepas de IBDV es capaz de realizar una infección aguda en las células DF-1P. Observamos, sin embargo, una ligera banda invariable entre mock e infecciones, correspondiente a la proteína basal producida durante la infección persistente. (Figura 23). Alcanzado este resultado podemos proponer dos teorías, las células persistentes no pueden ser re-infectadas o, por el contrario, el virus puede entrar en la célula, pero no tiene opción de replicar.

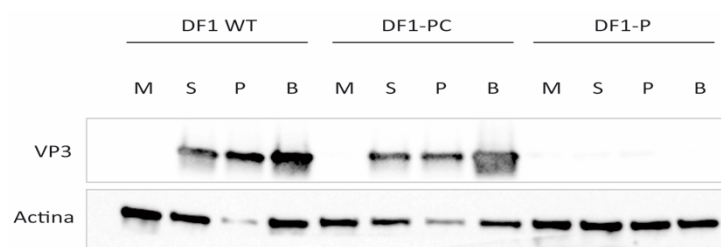


Figura 23. Infección de diferentes líneas DF-1 con diferentes cepas de IBDV. Se han infectado células DF-1, DF-1P y DF-1PC con las cepas Soroa (S), cepa P2 (P) y cepa Bursine (B) con multiplicidades de infección de 3 UFPU/célula. Transcurridas 18 horas de la infección fueron recogidas muestras proteicas que fueron sometidas a un SDS-PAGE seguido de un WB, utilizando anticuerpos contra la proteína estructural viral VP3 y la proteína celular actina.

Obtenido este resultado al infectar con IBDV y con el objetivo de discernir si las células DF-1P son inmunes a nuevas infecciones o, por el contrario, pueden volver a ser infectadas, nos propusimos realizar infecciones con diferentes virus RNA. Se escogieron tres virus, cada uno de ellos con diferente material genético: Reovirus (virus dsRNA), SFV-GFP (virus ssRNA de cadena +) y VSV-GFP (virus ssRNA de cadena -), además de IBDV como control negativo de la infección. Como habitualmente células DF-1 y DF-1PC fueron utilizadas como control. Se realizaron infecciones con diferentes MOIs, indicadas en M&M. Extractos proteicos fueron recogidos 18 horas p.i. y sometidos a SDS-PAGE seguido de WB contra proteínas virales en el caso de Reovirus (μ NS) e IBDV (VP3), o GFP en el caso de SFV o VSV. Como se muestra en la **figura 24** las células DF-1P se infecta por todos los virus utilizados a excepción de IBDV, por su parte las células DF-1 y DF-1PC se infectan con los 4 tipos virales.

El resultado muestra que las células DF-1P son susceptibles a la infección viral. Sin embargo, el nuevo IBDV inoculado aparenta tener problemas para replicar, impedimento que podría estar estrechamente relacionado con una elevada presencia de DVGs en el citoplasma celular.

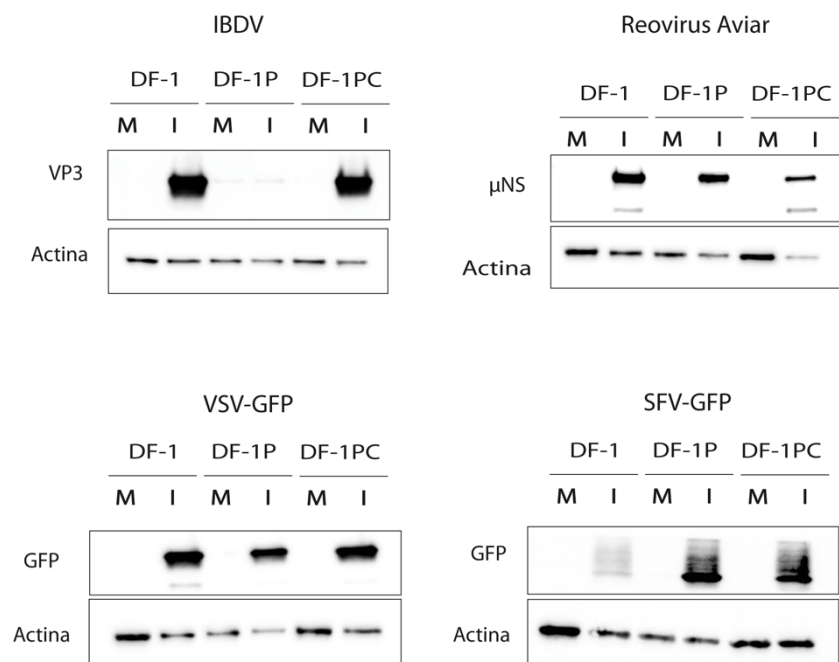


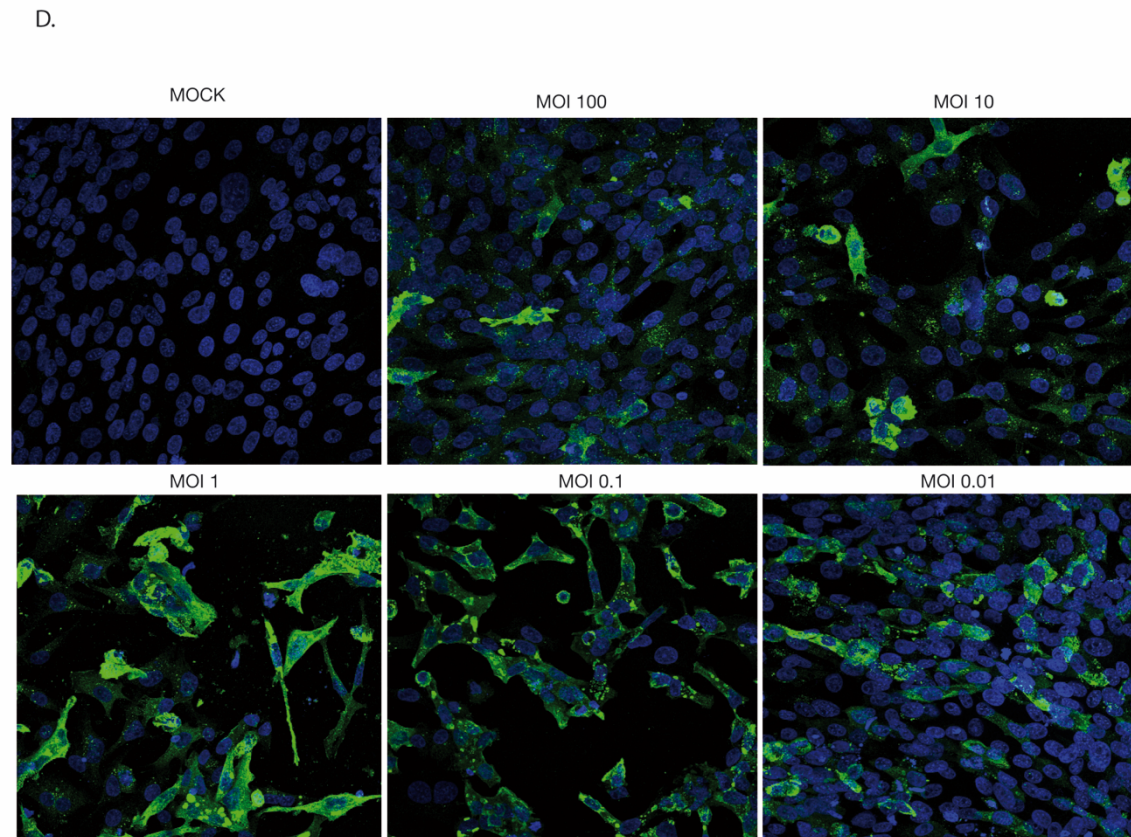
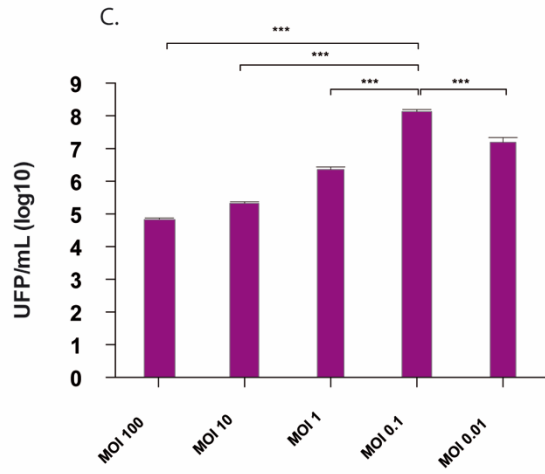
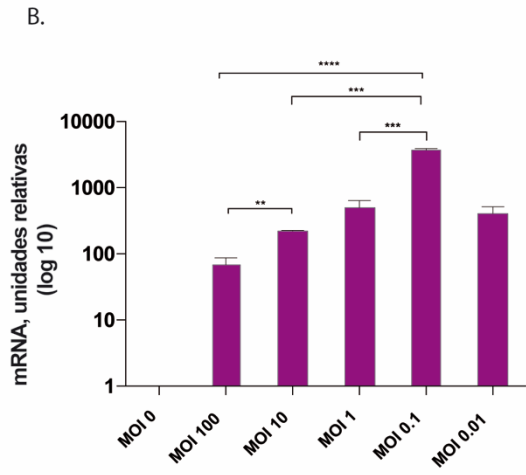
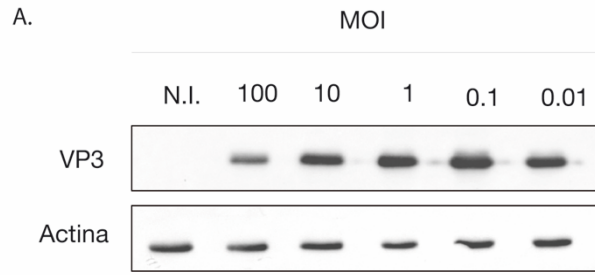
Figura 24. Infección de DF-1, DF-1P y DF-1PC con IBDV, Reovirus aviar, VSV-GFP y SFV-GF. Las monocapas celulares fueron infectadas y 18 h.p.i sometidas a un SDS-PAGE seguido de un WB contra GFP (en el caso de VSV y SFV) o proteínas virales: VP3 en el caso de IBDV y μ NS en el caso de Reovirus Aviar. Como control de carga se utilizó un anticuerpo contra la proteína celular actina.

3.3 La capacidad replicativa de IBDV es dependiente del input viral inicial.

El método estándar de titulación en el laboratorio siempre ha sido la dilución límite, gracias a ello se detectó que las células infectadas con elevado input viral sufrían menor efecto citopático que aquellas infectadas con MOIs en torno a 1 UFP/célula. Este fenómeno se observa constantemente y es independiente de la muestra o stock viral a titular.

La reiteración del resultado condujo a la realización de una aproximación experimental con el objetivo de lograr un estudio exhaustivo, y discernir qué ocurre con IBDV en esas condiciones. La aproximación que realizamos fue efectuar infecciones seriadas partiendo de una MOI de 100 UFP/célula y realizando diluciones 1:10 hasta la MOI 0,01 UFP/célula. Las infecciones se realizaron en células QM7 y se recogieron extractos celulares a 24 horas p.i. para ensayos de IF, WB, medición de progenie viral infectiva en el sobrenadante y RT-qPCR. Como se había observado de forma reiterada las células infectadas con MOI 100 o 10 UFP/célula sufren menor efecto citopático que aquellas infectadas con MOI 1 o 0,1 UFP/célula. Curiosamente, aunque acorde con la menor muerte celular, en las células infectadas con MOIs altas la replicación y consiguiente producción viral es menor. Observamos menor producción proteica mediante WB (**Figura 25.A**), menor expresión del segmento A viral por RT-qPCR (**Figura 25.B**), menor cantidad de progenie viral infectiva en el sobrenadante (**Figura 25.C**) y menos acumulación de VP3 dentro de la célula por IF (**Figura 25.D**). Es interesante recalcar que la cantidad total de virus aumenta a medida que desciende la MOI hasta llegar a MOI 0,1 UFP/célula, momento en el que encontramos el punto álgido de producción, tras el cual la producción desciende.

Figura 25. Análisis de infecciones con diferentes MOIs de IBDV en células QM7. Células QM7 fueron infectadas con MOIs 100, 10, 1, 0,1 y 0,01 UFP/célula y se mantuvieron en cultivo durante 24 horas, cuando se procedió a realizar un análisis de las mismas. **A.** Se recogieron muestras a 18 horas post infección con las que se realizó un ensayo de SDS-PAGE seguido de un WB utilizando anticuerpos contra la proteína viral VP3 y contra las proteínas celulares de actina. **B.** Se recogieron muestras de RNA y fueron sometidas a una RT-qPCR utilizando oligonucleótidos que hibridan en el segmento A de IBDV en la zona codificante para la proteína VP3. Las barras de error corresponden a datos de tres experimentos diferentes. Los corchetes indican comparación por parejas. **, $p < 0,001$, ***, $p < 0,0001$, ****, $p < 0,00001$, se utilizó una comparación ANOVA de dos direcciones. **C.** Se recogieron los sobrenadantes de la infección y se titularon mediante dilución límite. Las barras de error corresponden a valores de tres experimentos diferentes. Los corchetes indican comparación por parejas. ***, $p < 0,0001$, se utilizó una comparación ANOVA de dos direcciones. **D.** Células infectadas fueron fijadas y se realizó un ensayo de IF utilizando anticuerpos contra la proteína viral VP3 y DAPI para teñir el núcleo.



Los datos obtenidos en células QM7 indican que IBDV presenta problemas replicativos cuando es inoculado en grandes cantidades. Con estos datos surgió la incógnita de si los problemas se debían a la línea celular infectada o al propio virus. Para resolver la cuestión se decidió repetir el experimento utilizando células DF-1 y DF-1PC. El experimento se realizó de la misma manera que el explicado en el párrafo anterior, partiendo de una MOI 10 y recogiendo muestras 16 horas p.i. Los resultados fueron muy similares a los advertidos en QM7, comportándose las tres líneas celulares de la misma manera. La dinámica de la infección es igual en las tres líneas celulares. El título viral en el sobrenadante es inferior a MOI 10 que a MOI 1 (**Figura 26.A**), lo mismo ocurre al observar la cantidad de proteína viral VP3 expresada cuando se realiza el ensayo por WB (**Figura 26.B**).

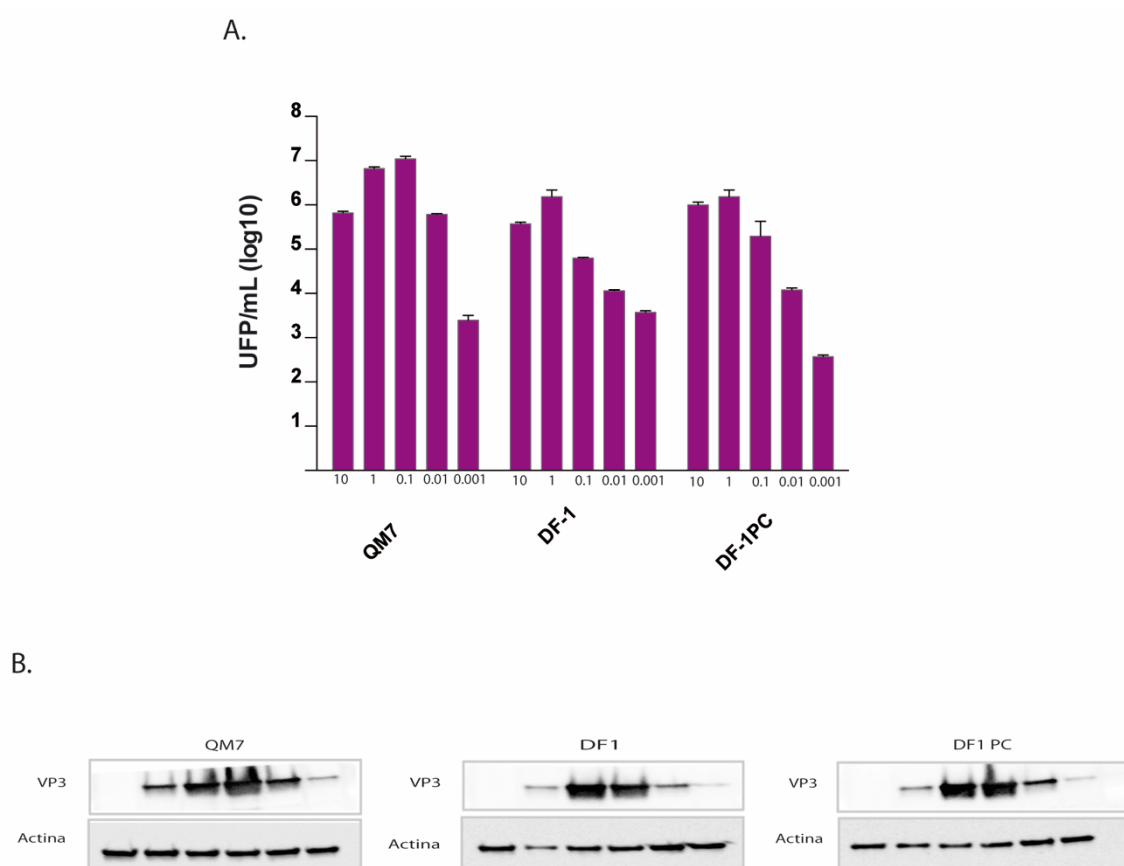


Figura 26. Análisis de título viral y acumulación de proteínas en infecciones con diferentes MOIs de IBDV en paralelo en células DF-1, DF-1PC y QM7. Se realizaron infecciones con MOIs 10, 1, 0,1, 0,01 y 0,001 UFP/célula de las tres líneas arriba mencionadas y se mantuvieron en cultivo 16 h.p.i. **A.** Titulaciones de los sobrenadantes por dilución límite. Los corchetes indican comparación por parejas. **B.** Muestras sometidas a un SDS-PAGE seguido de un WB con anticuerpos contra la proteína viral VP3 y las proteínas celulares de actina.

Asimismo, vemos que la expresión de genoma viral es máxima a MOI 0,1 UFP/célula en las tres líneas celulares (**Figura 27**). Por su parte, las imágenes obtenidas por IF muestran un fenotipo similar en las tres líneas celulares, puntuado a MOI 10, con aumento de la carga viral en el interior de las células a medida que desciende la MOI inicial (**Figura 28**).

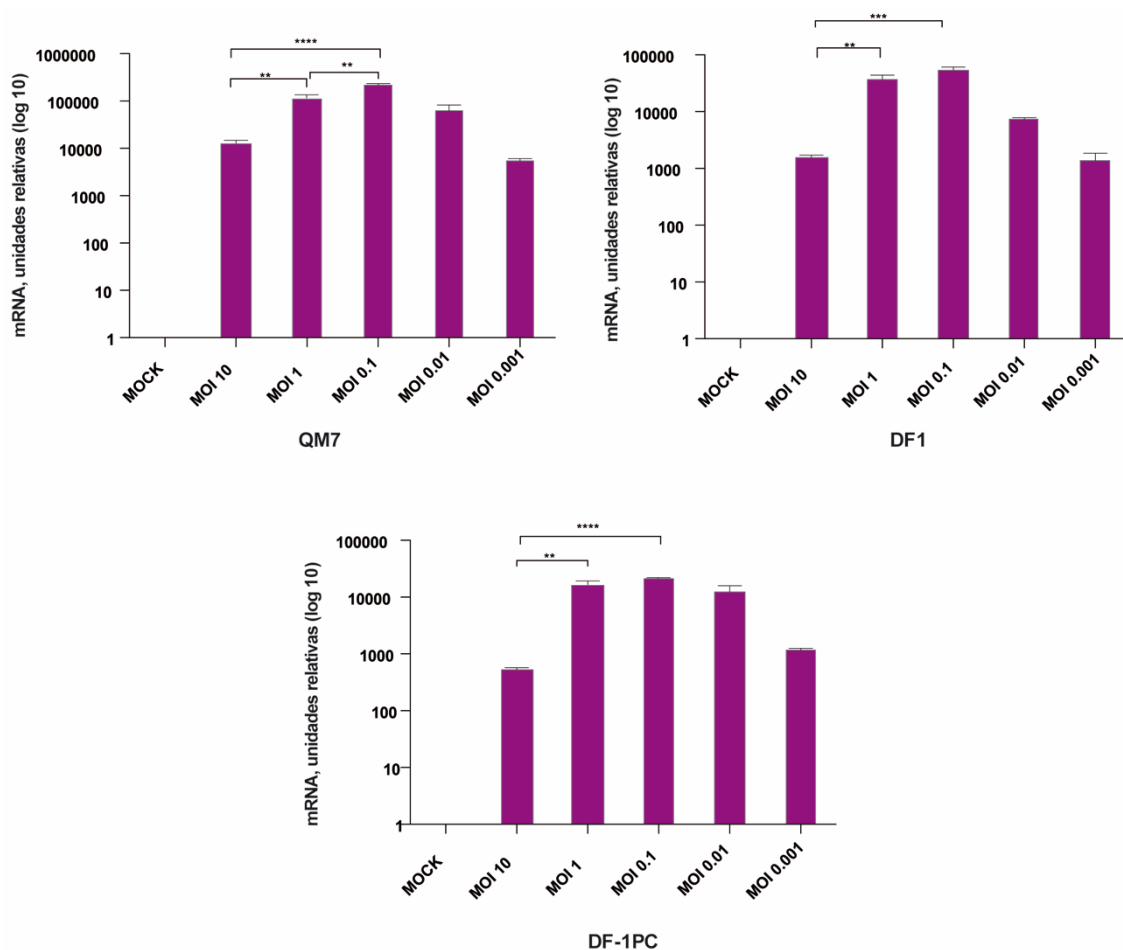
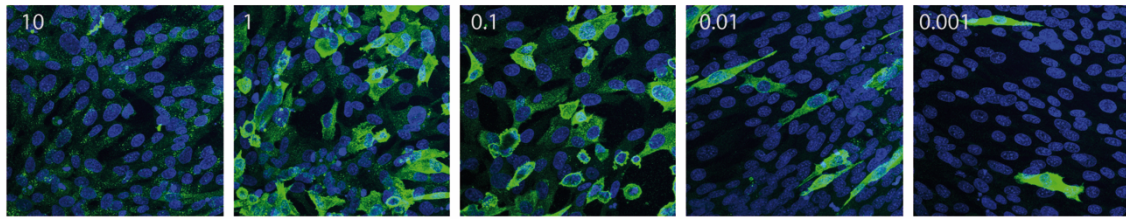
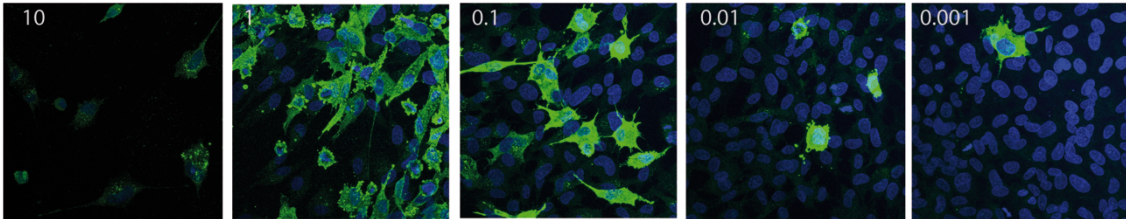


Figura 27. Análisis de la expresión viral en infecciones con diferentes MOIs de IBDV en paralelo en células DF-1, DF-1PC y QM7. Se realizaron infecciones con MOIs 10, 1, 0,1, 0,01 y 0,001 UFP/célula de las tres líneas arriba mencionadas y se mantuvieron en cultivo 16 h.p.i. Muestras de RNA obtenidas de las infecciones fueron sometidas a una RT-qPCR utilizando oligonucleótidos que hibridan en el segmento A de IBDV en la zona codificante para la proteína VP3. Las barras de errores corresponden a datos de tres experimentos diferentes. Los corchetes indican comparación por parejas, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, **** $p < 0,00001$, se utilizó una comparación ANOVA de dos direcciones.

QM7



DF1



DF1 PC

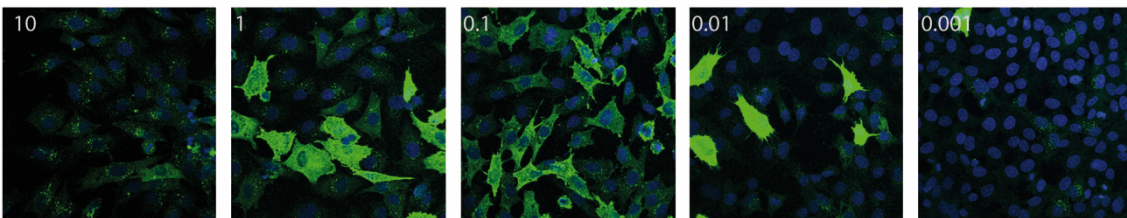


Figura 28. Ensayo de IF de infecciones con diferentes MOIs de IBDV en paralelo en células DF-1, DF-1PC y QM7. Se realizaron infecciones con MOIs 10, 1, 0'1, 0'01 y 0,001 UFP/célula de las tres líneas arriba mencionadas y se mantuvieron en cultivo hasta 16 h.p.i. Las células infectadas fueron fijadas y se realizó un ensayo de IF utilizando anticuerpos contra la proteína viral VP3 y DAPI para teñir el núcleo.

Con el fin de aportar datos numéricos referentes al porcentaje de células infectadas en cada condición, se realizó, con la ayuda del software Fiji, un recuento de células infectadas y células sanas en cada una de las condiciones anteriores. Para ello se utilizaron las fotos tomadas por IF y se tomaron como referencia 400 células aleatorias de cada condición. Como era de esperar, el porcentaje de células infectadas en cada condición es proporcional a la MOI inicial. (**Figura 29**).

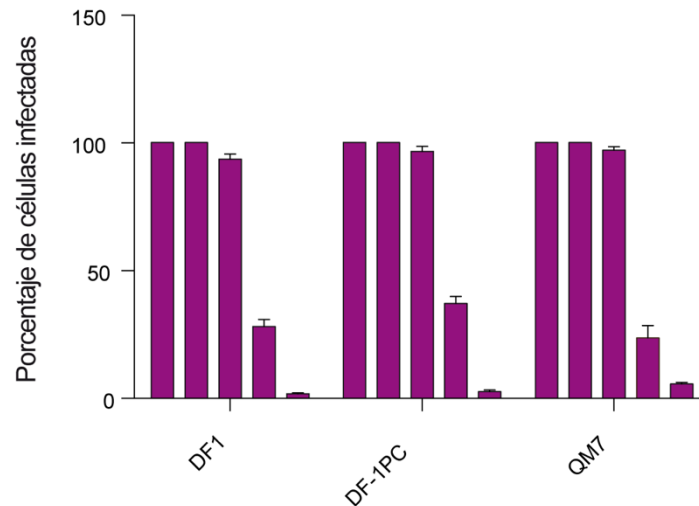


Figura 29. Porcentaje de células infectadas en infecciones con diferentes MOIs de IBDV en paralelo en células DF-1, DF-1PC y QM7. Se realizaron infecciones con MOIs 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 UFP/célula de las tres líneas arriba mencionadas y se mantuvieron en cultivo hasta 16 h.p.i. utilizando el software Fiji (Image J) se hizo un recuento de células infectadas con respecto a las células totales. Las barras de erros corresponden a datos de tres experimentos diferentes.

Podría estar dándose una relación directa entre la menor capacidad replicativa y la generación de DVGs. Estos DVGs se producirían en mayor medida cuando el input viral es elevado, y estarían impidiendo la correcta replicación del virus al competir por la polimerasa viral y demás elementos implicados en la replicación ¹⁵⁵.

3.4 Observamos genomas aberrantes y diferencias en la replicación tras realizar un análisis de la secuenciación de RNA (NGS) de células QM7 infectadas con diferente input viral.

Los resultados obtenidos en este apartado 3 presentan muchas características que pueden ser relacionadas con la presencia de genomas virales defectivos. Por esta razón, y teniendo en mente la realización de un estudio en profundidad de los elementos implicados en la infección, se decidió realizar una secuenciación del RNA extraído de infecciones causadas por IBDV. Siguiendo los experimentos mencionados en el apartado anterior se decidió analizar el RNA de células QM7 infectadas con MOIs 100-0,1 UFP/célula.

La secuenciación de RNA se realizó de la forma que aparece descrita en el apartado de M&M dando lugar a una amalgama de lecturas. Las lecturas obtenidas, tras ser filtradas por un control de calidad, fueron mapeadas contra el genoma de IBDV para analizar los niveles de cobertura. Con la idea de localizar lecturas aberrantes que pudieran ser identificadas como DVGs, y profundizar más para tener una idea más completa de qué es lo que está ocurriendo, se decidió

mapear las secuencias contra el genoma de IBDV usando BLAST (BLAST es capaz de localizar secuencias que mapean en diferentes zonas del genoma; coincidencias múltiples). Las lecturas con dos o más asignaciones de alta calidad (< 98% de similitud) fueron seleccionadas y analizadas. Se localizaron lecturas en las que se producía un salto en el genoma, lecturas que alineaban en sentidos opuestos en el genoma y lecturas que alineaban en segmentos diferentes (entre los segmentos A y B de IBDV). Dados estos resultados se decidió hacer un estudio en profundidad utilizando DI-TECTOR, software que tiene capacidad de distinguir entre diferentes tipos de aberraciones en las lecturas; aberraciones que relaciona con diferentes tipos de DVGs. Los resultados obtenidos fueron muy similares a los obtenidos por BLAST, localizando DVGs de deleción, inserción y copy-back (**Figura 30**). Es reseñable que las lecturas defectivas aparecen en todas las multiplicidades de infección por lo que se puede concluir que IBDV genera secuencias aberrantes durante su proceso infeccioso.

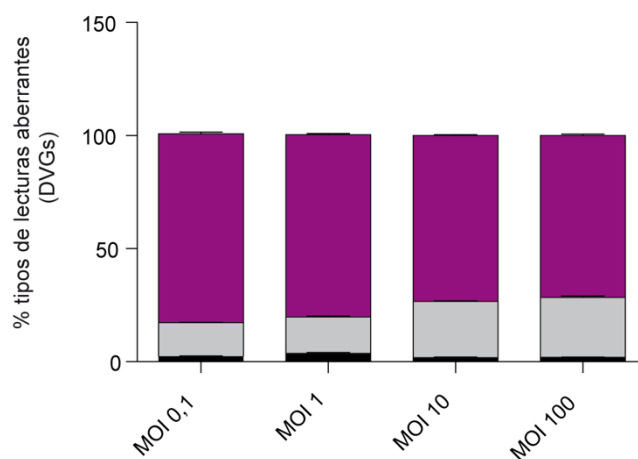


Figura 30. Porcentaje de tipos de DVGs encontrados por secuenciación de RNA en infecciones de IBDV en QM7. Secuenciación de RNA viral de células QM7 infectadas con las MOIs que aparecen en la gráfica. Con la herramienta DI-TECTOR se han localizado genomas aberrantes de diferentes tipos: Deleción (morado), Inserción (gris) y Copy-back, tanto en 3' como en 5' (negro).

Una vez localizada la presencia de DVGs se decidió calcular la cantidad total de lecturas que mapean en IBDV y compararlas porcentualmente con las lecturas totales. Se observa que la cantidad de lecturas totales es muy superior en las células infectadas con MOI 1 UFP/célula, siendo esta 8 veces superior a las células infectadas con MOI 10 UFP/célula y 53 veces superior a las células infectadas con MOI 100 UFP/célula, además, la diferencia en el número de lecturas entre MOI 10 y 100 UFP/célula es de 7 veces (**Figura 31 A.**). Siguiendo esta dinámica se calculó porcentualmente la cantidad de lecturas defectuosa (relacionadas con DVGs) con respecto a las

lecturas virales totales. El resultado muestra que las células infectadas con MOIs 10 y 100 UFP/célula presentan un porcentaje significativamente mayor de lecturas aberrantes que las infectadas con MOIs 1 y 0,1 UFP/célula (**Figura 31 B.**).

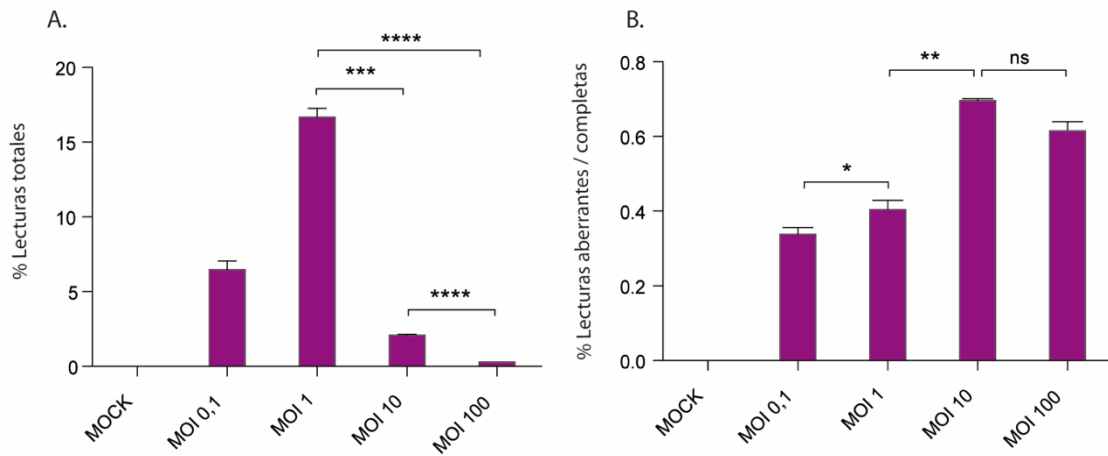


Figura 31. Análisis de las lecturas virales encontradas por secuenciación de RNA en muestras de QM7 infectadas con diferentes MOIs de IBDV. Monocapas de células QM7 fueron infectadas con las MOIs que aparecen en la figura y 24 h.p.i. sometidas a un ensayo de secuenciación de RNA. **A.** Porcentaje de lecturas virales con respecto a lecturas totales. **B.** porcentaje de lecturas aberrantes de IBDV con respecto a lecturas completas de IBDV. Los corchetes indican comparación por parejas. * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, **** $p < 0,00001$, se utilizó el test ANOVA de dos direcciones.

Tras realizar los análisis se observó que, curiosamente, la cantidad de lecturas que mapean en el segmento B es siempre superior a las que mapean en el segmento A, variando en proporción dependientemente de la MOI inicial, a mayor MOI inicial, y por lo tanto menor replicación, mayor proporción de segmento B (**Figura 32**).

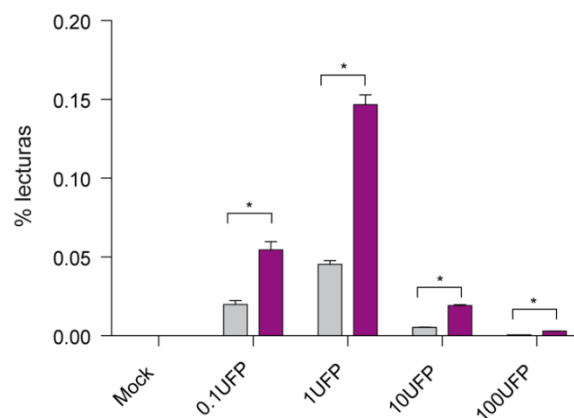


Figura 32. Porcentaje de lecturas encontradas por secuenciación de RNA de muestras de QM7 infectadas que mapean en el segmento B y segmento A de IBDV. Infección de células QM7 con las MOIs indicadas en la figura y análisis por secuenciación de RNA. Representación del porcentaje de lecturas que mapean en el segmento A (gris) o en el segmento B (morado). Los corchetes indican comparación por parejas. *, $p < 0,01$, se utilizó una prueba T de student de dos colas utilizando el método de corrección Holm-Sidak.

DISCUSIÓN

Los virus son organismos con estructura muy sencilla, únicamente compuestos por proteínas y ácidos nucleicos, que son capaces de replicar y prosperar utilizando el metabolismo de otros organismos específicos, en la mayoría de los casos causando su muerte. Teóricamente, la relación virus-célula parece sencilla, aunque nada más lejos de la realidad. La multitud de virus existente produce infecciones en diferentes células y de infinitas maneras diferentes. Siendo muchos de ellos no solo capaces de infectar hasta conseguir la muerte celular, sino también de establecer infecciones persistentes. Este es el caso de IBDV, el virus es capaz de llegar a un equilibrio cuasi perfecto entre el metabolismo celular y la replicación viral, dando lugar a la infección persistente. En la naturaleza, la infección por IBDV produce una muerte masiva de linfocitos de la Bursa de Fabricio que desencadena, en la mayoría de los casos, la muerte del animal pasados 3-4 días p.i. Sin embargo, hay ciertas aves capaces de sobrevivir a la infección pudiendo llegar a presentar una infección persistente⁸⁹⁻⁹¹.

Hasta el momento de la realización de este trabajo los mecanismos que llevan al establecimiento de estas infecciones persistentes eran totalmente desconocidos. Sin embargo, los resultados obtenidos durante estos años arrojan luz sobre qué es lo que está ocurriendo a nivel molecular y cómo se consigue el equilibrio virus-célula.

1. IBDV es capaz de general infecciones persistentes en cultivo celular.

Hasta el inicio de este estudio, en el laboratorio se había llegado a observar el establecimiento de infecciones persistentes, y la capacidad de mantenimiento en cultivo de estas células, en la línea celular DT-40⁹². Ésta línea celular ha sido inmortalizada gracias a la infección con el virus de la Leucosis Aviar (AVL), hecho que impidió la correcta caracterización de la infección persistente causada por IBDV. El AVL podría interferir con IBDV y con los mecanismos celulares implicados en el establecimiento de la infección persistente llevando a la obtención de información errónea o sesgada. Sin embargo, este hallazgo confirmó la posibilidad de establecer infecciones persistentes *in vitro* por parte de IBDV.

Tiempo después, se comenzó a notificar que, a pesar de que una infección por IBDV en células DF-1 conlleva un efecto citopático masivo con la muerte de más del 99% de las células, tras la infección en cultivos celulares hay un pequeño porcentaje de células que sobrevive. Estas células fueron mantenidas en cultivo con el objetivo de comprobar si eran capaces de generar una línea estable persistentemente infectada. En efecto, las células supervivientes a la infección acaban creando una monocapa de células persistentemente infectadas por IBDV. Tras la creación de la monocapa y durante un periodo aproximado de 3 meses, las células persistentes sufren fluctuaciones de muerte celular, es decir, periodos de tiempo en los que se intercalan etapas con

unos niveles elevados de apoptosis y otros en los que la monocapa permanece estable. Estas fluctuaciones podrían darse a causa de varios factores, por un lado, alteraciones en la capacidad replicativa de IBDV y, por otro lado, variación fenotípica dentro de la monocapa de células. Por un lado, la presencia de DVGs (que será ampliamente comentada más adelante) podría explicar la variación en la capacidad replicativa del virus. La acumulación de DVGs en el citoplasma celular varía a lo largo de la infección y esta inversamente relacionada con la de genomas virales completos, los DVGs provocan una competición por los elementos replicativos virales impidiendo la correcta replicación de genomas completos^{123,154}. Otro factor a tener en cuenta que podría estar relacionado con las fluctuaciones en los niveles de muerte celular, es que, al inicio de la infección persistente, las células presentes son fenotípicamente diferentes al haberse originado a partir de clones aislados supervivientes a la infección. En un periodo de 21 días la placa pasa de tener 10 células a miles. Dentro de la amalgama de células, aparecen fenotipos con diferente susceptibilidad a la infección, encontramos células más sensibles y otras más resistentes al virus¹⁵⁶. Durante la estabilización de la infección, las células menos resistentes mueren, mientras que las más resistentes se mantienen en cultivo. Al final del proceso de estabilización de la línea, la colonia, o colonias, mejor adaptadas a las condiciones del medio son las que predominan en el cultivo; son seleccionadas de forma darwiniana¹⁵⁶.

Por lo tanto, la variación en la supervivencia de las nuevas células persistentes estaría relacionada tanto con el virus como con la propia célula¹⁵⁷. Una vez transcurridos estos primeros tres meses en los que se producen las fluctuaciones, las células pueden permanecer en cultivo celular de forma estable durante meses. Se ha observado que siguen existiendo fluctuaciones en la cantidad de progenie infectiva y proteínas virales, pero no se producen crisis a nivel de muerte celular. La variación dependiente de DVGs sigue existiendo, pero no lo hace la muerte de las células más susceptibles a la infección, ya que, se ha producido una selección de las mejor adaptadas.

El establecimiento de infecciones persistentes se ha observado en células QM7 y HeLa, comportándose estas células de forma muy similar a lo observado en DF-1. Estos resultados no se muestran en este trabajo.

2. El IBDV persistente no presenta diferencias significativas con respecto al IBDV WT parental.

El virus presente en las células persistentes generó muchas incógnitas: ¿Es el IBDV persistente menos virulento? ¿Tiene una menor capacidad replicativa? ¿Presenta alguna característica que le aporte una facilidad para el establecimiento de infecciones persistentes? Con el objetivo de

analizar el virus presente en las células DF-1P se han realizado una batería de ensayos que concluyen que los niveles de replicación de IBDV en las células DF-1P son menores a los encontrados en las infecciones agudas. La información obtenida nos llevó a pensar que la disminución de la replicación viral podría estar relacionada con la selección de un virus menos virulento.

Se ha descrito que durante el establecimiento de infecciones persistentes por parte del virus aviario de la bronquitis infecciosa (IBV) se producen variaciones en el genoma que podrían estar ayudando al establecimiento de la persistencia¹⁵⁸. Algo parecido podría haber estado ocurriendo con IBDV en algún gen implicado en replicación o virulencia. Sin embargo, tras realizar un análisis genético comparativo entre virus procedentes del stock parental y virus procedente de sobrenadante de infecciones persistentes, no se apreciaron diferencias significativas. Se descartó de esta manera la existencia de mutaciones o variaciones que pudieran influir en un cambio en la virulencia, capacidad replicativa o algún otro elemento viral en IBDV persistente.

Siguiendo con la comparación entre virus parental y virus persistente, titulaciones paralelas de virus procedente de infecciones por virus WT y virus persistente fueron realizadas. Las titulaciones muestran una mayor progenie viral infectiva en las células infectadas con el virus procedente de infecciones persistentes. No solo se desmiente de esta manera la hipótesis de que el virus causante de las infecciones persistente tiene menor capacidad replicativa, sino que, contrariamente, se observa que su capacidad replicativa es mayor. La mayor presencia de DVGs en las células DF-1P podría ser la explicación de la mayor eficiencia replicativa del virus persistente. La competición entre los DVGs y genomas completos, que habitúan a ganar los DVGs, provoca que el virus que se consigue mantener en cultivo sea aquel que presenta una elevada fuerza replicativa, el virus capaz de continuar replicando a pesar de las condiciones adversas¹⁵⁴.

Por último, se han realizado infecciones para comparar la capacidad de establecer infecciones persistentes por parte de IBDV WT e IBDV persistentes. Ambos virus presentan la misma capacidad para crear infecciones persistentes, o al menos, la presentan con multiplicidades de infección baja. Sin embargo, si se tiene en cuenta que durante una infección persistente se generan DVGs en una proporción mayor a la observada en una infección aguda¹⁵⁹ y considerando que estos DVGs tuvieran capacidad de ser encapsados en DIPs¹⁰², lo más probable es que al realizar infecciones con una MOI elevada se estaría inoculando una gran cantidad de DIPs junto con IBDV WT, provocando esto una infección persistente de manera más rápida. Por el momento, la encapsación de DVGs dentro de partículas virales no se ha descrito en IBDV, por lo que

únicamente podemos considerar este fenómeno como una hipótesis plausible todavía no comprobada.

3. La capacidad de respuesta a interferón es importante para el establecimiento de infecciones persistentes por parte de IBDV.

Durante la realización de esta tesis doctoral se ha utilizado el reactivo 7-DMA para eliminar el virus de las células DF-1P, generando de esta manera la línea DF-1PC. La eliminación de IBDV ha permitido el análisis de las posibles características celulares relacionadas con el establecimiento de infecciones persistentes. Gracias a los resultados obtenidos en estos análisis se ha comprobado que la línea DF-1PC tiene mayor facilidad para el establecimiento de infecciones persistentes y que la no respuesta a IFN que éstas presentan, causada por la expresión del receptor IFNAR-2 truncado, tiene un papel crucial en el proceso.

Estudios recientes del laboratorio han demostrado que el IFN y muchas de sus ISGs tienen un papel crucial en las infecciones causadas por IBDV⁶⁰. Durante la infección se produce una liberación de IFN por parte de las células y éste interacciona con las células de la monocapa. Por un lado, la interacción del IFN con la propia célula que lo produce (vía autocrina) conlleva la activación de las rutas de señalización del IFN que desencadena la respuesta de las ISGs y éstas, a su vez, activan rutas apoptóticas de manera exacerbada. Por otro lado, las interacciones del IFN con las células no infectadas (vía paracrina) desencadenan un estado antiviral que protege a las células de la infección¹⁶⁰. Para entender mejor la cascada de señalización antiviral dependiente de IFN hay que saber que está compuesta por dos rutas: la ruta de transactivación y la ruta JAK-STAT. En la ruta de transactivación están involucradas multitud de proteínas centinela y efectoras y es activada por la presencia de patrones asociados a moléculas de patógenos (PAMP), llevando a cabo la expresión de IFN de tipo 1 y de un conjunto de ISGs¹⁵¹. Por su parte la ruta JAK-STAT se activa por la unión de IFN de tipo 1 al receptor formado por la unión de los receptores IFNAR-1 e IFNAR-2, provocando una cascada de señalización que induce la expresión de diversas ISGs con diferentes funciones dentro y fuera de la célula⁶².

3.1 Las células DF-1PC y DF-1P expresan una versión truncada del receptor IFNAR-2.

Se han localizado dos mutaciones puntuales tras la secuenciación y comparación de los genomas de DF-1 y DF-1PC, estas mutaciones se encuentran en el gen que expresa IFNAR-2, y son mutaciones que convierten los codones que las contienen en codones stop. Las mutaciones

impiden la correcta expresión de la proteína, en concreto, de su región citoplasmática, y como consecuencia imposibilitan el correcto funcionamiento de la ruta JAK-STAT.

Antes de localizar las mutaciones causantes de la no respuesta a IFN, se realizaron una serie de experimentos que llevaron a la notificación del defecto en la ruta. El primer indicio observado fue la diferencia de comportamiento entre células DF-1 y DF-1PC al ser tratadas con IFN- α . A diferencia de lo observado en DF-1, al realizar un tratamiento con IFN- α en células DF-1PC no se induce un estado antiviral, pudiendo ser las células infectadas sin problemas por VSV-GFP (virus extremadamente sensible a la protección inducida por IFN). Observamos el mismo resultado en células DF-1P, por lo que, como comentaré más adelante, el fallo en la respuesta a IFN es previo a la curación de las células con 7-DMA y está presente en las células persistentes. Con el objetivo de profundizar en el tema se realizaron una serie de RT-qPCRs para medir la expresión de ISGs activadas tras la respuesta celular a IFN- α , y se comprobó que las ISGs Mx y OAS (ambas activadas gracias a la activación de la cascada de señalización JAK-STAT) no se expresan tras el tratamiento en células DF-1PC.

Tras obtener los resultados de los ensayos de secuenciación de los genomas completos de DF-1 y DF-1PC que permitieron la localización de las dos mutaciones puntuales, se decidió realizar un ensayo de recuperación de la proteína. El objetivo era comprobar si estas mutaciones eran las únicas causantes del fallo en la ruta. Para la aproximación se transfectó un plásmido pCI-Neo con expresión de la proteína funcional IFNAR-2 en células DF-1PC (dando lugar a células DF-1PC-IFNAR-2), seguido de un tratamiento con INF- α y posterior análisis por RT-qPCR. Los niveles de Mx y OAS en estas células transfectadas son muy similares a los observados en células WT, por lo que se puede concluir que la ausencia de IFNAR-2 es la causante de la no expresión de ambas ISGs y consecuentemente del fallo en la cascada de señalización inducida por la ruta JAK-STAT.

3.2 Las células DF-1PC sufren menos apoptosis y mayor entrada en persistencia que las DF-1 WT.

Las células DF-1PC sufren menos apoptosis que las DF-1 WT tras ser infectadas por IBDV. En el transcurso de una infección por IBDV en células DF-1 WT la supervivencia ronda el 0,0023%, mientras en células DF-1PC la supervivencia es superior al 30%, todas estas células supervivientes son portadoras de IBDV de forma persistente y son capaces de establecer una monocapa estable pasados 21 días. El hecho de que no haya ruta JAK-STAT está estrechamente relacionado con la disminución en la muerte celular. Cabe destacar que estas dos mutaciones se encuentran, a su vez, en las células DF-1P. Se podría intuir que hay una relación directa entre la menor inducción de apoptosis y el establecimiento de infecciones persistentes; la ausencia de la cascada de

señalización inducida por IFN tendría un papel crucial para lograr el establecimiento de infecciones persistentes por parte de IBDV.

3.3 La ausencia de la cascada de señalización inducida por la ruta JAK-STAT disminuye la apoptosis y favorece el establecimiento de persistencia en células HeLa.

Los resultados obtenidos en células DF-1 son totalmente reproducibles en otra línea celular con ausencia de IFNAR-2, en concreto, se ha probado una línea HeLa KO para este receptor. Los resultados obtenidos son idénticos a los descritos en DF-1PC, las HeLa IFNAR-2 KO sobreviven en un porcentaje mayor al de las HeLa WT en una infección por IBDV y, además, son capaces de establecer infecciones persistentes de manera más rápida y efectiva. Cuando se produce un bloqueo en la ruta de respuesta del IFN disminuye la cantidad de muerte celular y aumenta el porcentaje de células que desarrollan una infección persistente por IBDV, independientemente de la línea celular en la que ocurra.

3.4. ¿Qué fue antes la mutación o la persistencia?

Dentro del amplio mundo de las persistencias virales aparecen un gran número de virus que son capaces de interactuar con el sistema inmune para favorecer su propia supervivencia⁹⁴. En el caso de IBDV podría estar ocurriendo algo similar, de hecho, se ha realizado una secuenciación masiva de RNA que sugiere una alteración en rutas anti-apoptóticas (estos resultados requieren de un estudio más exhaustivo y no aparecen en este trabajo). Sin embargo, la existencia de las mutaciones que impiden la correcta expresión de IFNAR-2 no parecen ser fruto de una interacción virus-célula, si no que las células con la mutación están presentes en un cultivo normal de células DF-1 y son seleccionadas de forma darwiniana gracias a su resistencia a la infección. En el conjunto de células que forman la primera monocapa de células infectadas persistentemente, aquellos clones que desde el inicio no expresan IFNAR-2 son los supervivientes. En el inicio de la infección persistente tienen lugar las ya mencionadas fluctuaciones de muerte celular. Dentro de la amalgama de tipos celulares presentes es este momento, las células que expresen IFNAR-2 mutado serían las más resistentes a la infección y las que sobrevivirían tras los diversos ciclos de muerte celular masiva. Podría haber ocurrido este mismo fenómeno con algún otro gen implicado en la ruta del IFN y seguramente el resultado final sería similar. En el laboratorio se ha generado una línea de DF-1 KO para el gen que expresa TRIM-25, proteína implicada en la ruta de transactivación del IFN. Con esta línea se han realizado infecciones con IBDV y se ha observado la capacidad de entrada en persistencia. Estas células no

solo sufren menos muerte si no que entran en persistencia de una manera más rápida que las células DF-1 WT. Estos resultados no aparecen en este trabajo.

3.5 Cascada de señalización inducida por la infección de IBDV en la naturaleza.

Por último, cabe destacar que IBDV únicamente es capaz de desarrollar infección aguda en pollos, en el resto de aves no se desarrolla enfermedad y muchas de ellas son portadoras de IBDV de forma leve o persistente, convirtiéndose en vectores de transmisión del virus¹⁶¹. Los pollos son las únicas aves que no expresan la proteína RIG-I, en esta especie es MDA-5 la encargada de reconocer dsRNA y activar la cascada de señalización de IFN. Se ha descrito una mayor susceptibilidad de los pollos a determinadas cepas del Virus de la Gripe asociada a la ausencia de la proteína RIG-I¹⁶². Este hallazgo, sumado a los resultados obtenidos en relación a la respuesta inmune y el establecimiento de infecciones persistentes, lleva a pensar que el hecho de tener un sistema de activación de la ruta de IFN diferente al de otras aves haga que los pollos sean más susceptibles a IBDV, y que otras aves no sufran la enfermedad, pero sean capaces de ser portadoras del virus de forma persistente.

4. Las infecciones causadas por IBDV en cultivo celular generan DVGs.

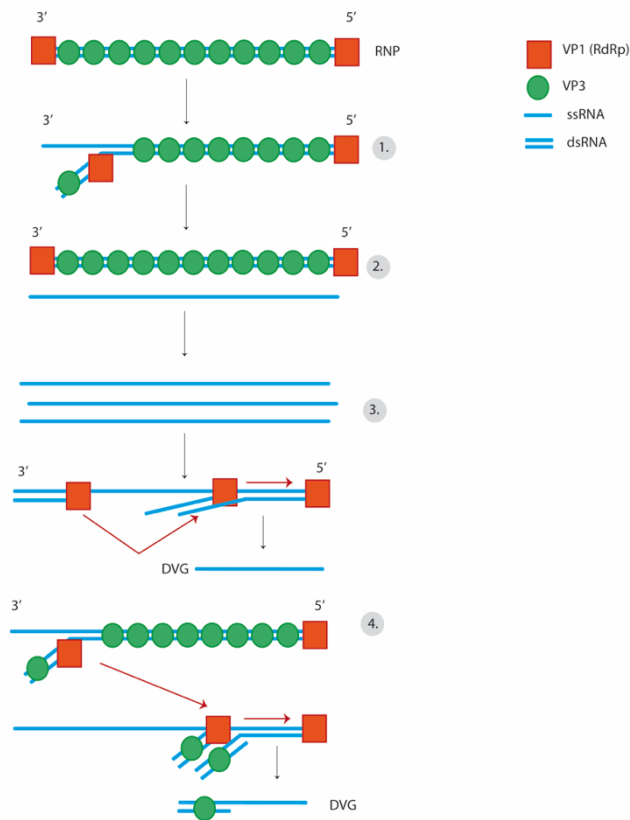
En este momento y teniendo en cuenta los datos de los que se dispone, solo podemos lanzar hipótesis sobre los DVGs como causantes de las características de la infección comentadas hasta ahora. Sin embargo, lo que sí que podemos asegurar es que estos DVGs están presentes en las infecciones causadas por IBDV.

Dados los resultados obtenidos por técnicas de biología molecular y con el objetivo de obtener datos precisos sobre la presencia de DVGs, se propuso realizar una secuenciación de RNA utilizando la tecnología NGS de Illumina y secuenciando RNA obtenido de infecciones con diferentes MOIs de IBDV. De esta secuenciación se obtienen multitud de lecturas de 150pb que fueron analizadas y mapeadas contra genoma celular y viral. Tras un análisis de calidad y gracias a la utilización de los softwares BLAST y DI-TECTOR, se han podido localizar lecturas con secuencias que mapean en varias zonas de los segmentos de IBDV, se han encontrado lecturas que mapean en 2, 3 y 4 zonas diferentes, siendo las que mapean en dos zonas las mayoritarias. Estas secuencias podrían formar parte de DVGs, y gracias al software DI-Tector se han localizado DVGs de delección, inserción y copy-back. Los análisis realizados muestran que los DVGs mayoritarios son los DVGs de delección, en los que la polimerasa se ha saltado una o varias regiones del genoma para seguir replicando. Con menor frecuencia, aunque en un número importante, aparecen DVGs en los que se ha producido una inserción. Por último, y siendo los

minoritarios, encontramos fragmentos que hibridan en la secuencia en un sentido y que posteriormente hibridan en esa misma secuencia, pero en una región anterior y con dirección contraria; estos DVGs serían los DVGs de copy-back previamente descritos (**Figura 5**)¹²⁴. Las lecturas defectivas se han encontrado en todas las muestras de células infectadas enviadas a secuenciar, aunque, es importante destacar que encontramos una amplia diferencia en el porcentaje de estas lecturas con respecto a lecturas virales totales, siendo este porcentaje significativamente mayor al infectar con MOI de 10 o 100 UFP/célula. Las células infectadas a estas MOIs sufren menor muerte celular y menor expresión viral. Los genomas virales defectivos aparecen en la mayoría de infecciones causadas por virus RNA y, como se ha comentado, tienen la capacidad de interferir con la correcta replicación del virus, ya sea compitiendo por la RdRp o por proteínas virales, o interactuando con diferentes mecanismo celulares¹²⁴. En las infecciones con MOIs de 10 o 100 UFP/células el mayor porcentaje de DVGs provocaría una interacción con los segmentos sanos impidiendo que el virus infectivo prospere.

Un posible modelo explicativo para la generación de DVGs es que durante la replicación de la dsRNA (la cual se encuentra rodeada y protegida por VP3), una de las dos hebras conformantes de la doble hebra inicial queda libre en el citoplasma (y sin unión a VP3) (**Figura 4**), esta hebra puede ser transcrita a RNAm para expresar proteínas o entrar en un nuevo ciclo replicativo, cuando esta hebra entra en el ciclo replicativo es cuando se comienzan a producir los errores al producirse saltos aleatorios de la RdRp, dando lugar a los DVGs. De la misma manera podría ocurrir que durante la replicación de la doble hebra, la RdRp salte a una hebra única libre en el citoplasma, dando lugar a más DVGs. Estas aberraciones del genoma producidas en la replicación se comienzan a acumular en el citoplasma, debido a su menor tamaño, compitiendo por los elementos implicados en replicación y ensamblaje viral e impidiendo de esta manera la producción de proteínas funcionales y virus infectivo (**Figura 33**).

Figura 33. Modelo del posible mecanismo para la formación de DVGs en IBDV. 1. Comienzo de la replicación del segmento de IBDV y formación de una nueva doble hebra de RNA. 2. Nuevo dsRNA y hebra libre en el citoplasma. 3. Las hebras libres se acumulan y pueden ser utilizadas como mRNA para la expresión de proteínas o ser utilizadas como cadena molde para la replicación. 4. La replicación de la hebra de RNA puede causar DVGs al cometer errores la RdRp, como por ejemplo un salto de una región a otra del segmento, como se muestra en la figura. Además, durante la replicación de la doble hebra se puede producir un salto de la polimerasa a una hebra libre dando lugar a un nuevo DVG.



4.1 Interferencia de DVGs con el ciclo replicativo de IBDV y relación con el establecimiento de infecciones persistentes.

Hasta ahora se han mencionado varias características de la infección por IBDV que pueden estar relacionadas con la presencia de DVGs. Sin embargo, todavía quedan por comentar ciertas especificidades en las infecciones por IBDV para las que la presencia de DVGs es la explicación más plausible.

4.1.1 La variabilidad fenotípica célula-célula dentro de la monocapa infectada por IBDV podría estar relacionada con la acumulación de DVGs.

Transcurridas 18 horas de la infección por IBDV en cultivos celulares (utilizando MOIs por encima de 3 UFP/célula) se observa una variabilidad fenotípica célula-célula a lo largo de toda la monocapa celular. En los ensayos de IF se puede observar que muchas de las células presentan una baja expresión de proteínas virales, mientras que a su lado se observan otras con una elevada replicación y expresión de proteínas. Durante una infección viral no todas las células están en el mismo momento del ciclo replicativo debido, en su mayoría, a segundas rondas de infección y replicación causadas al ser liberado el virus de una célula e infectar una segunda. Sin embargo, y

teniendo en cuenta que al infectar con MOIs superiores a 3 UFP/célula la mayoría de células se infectan a la vez y desde el principio, la relación de la heterogeneidad fenotípica con un segundo ciclo de infección queda prácticamente descartada, si bien, podría ser la causa de la heterogeneidad en alguna célula concreta. No obstante, la heterogeneidad existe y las imágenes obtenidas sugieren que hay algún elemento, con características similares a los DVGs, interfiriendo con la correcta expresión viral. Los DVGs interfieren con la infección de múltiples maneras y se han descrito como causantes de la heterogeneidad del fenotipo célula-célula en la infección de virus como el virus de Sendai¹³⁷, en el caso de IBDV podría estar ocurriendo algo similar. La monocapa infectada presentarían ciertas células en las que la replicación de DVGs es mayoritaria, en ellas la acumulación de los DVGs estaría favorecida, por lo que la replicación de genomas completos con capacidad de expresar proteínas funcionales sería baja (fenotipo punteado), mientras que en otro porcentaje de células, la replicación de genomas completos sería la que se encuentra favorecida, por lo que se daría la expresión y acumulación de proteínas funcionales en el citoplasma (fenotipo con grandes acumulaciones de VP3)¹⁵⁴.

El fenotipo punteado, además de característico en infecciones con MOI alta, también lo es de células infectadas de forma persistente. Cuando se realizan ensayos de IF en células infectadas persistentemente se aprecia un fenotipo muy similar al que aparece en las imágenes de infección aguda en las células con menor expresión de proteínas. Esta similitud, sumada al hecho de que en las células persistentes la producción viral es muy baja hace pensar que los DVGs puedan estar presentes y ser un elemento imprescindible para el establecimiento de la persistencia. Las células que consigan llegar a un equilibrio entre DVGs y virus estándar consiguen establecer una relación de persistencia con el virus.

4.1.2 Un input viral inicial elevado conlleva a una mayor acumulación porcentual de DVGs y a la consiguiente menor producción de proteínas virales y virus infectivo.

A lo largo de los años de trabajo con IBDV y gracias a las titulaciones por dilución límite, se ha observado que los cultivos celulares infectados con multiplicidades de infección altas (por encima de 10 UFP/célula) sufren menos apoptosis que los cultivos infectados con multiplicidades de infección más bajas (por debajo de 1 UFP/célula). Con el objetivo de vislumbrar la causa se realizaron infecciones seriadas con IBDV partiendo de MOI 100 o 10 UFP/célula hasta MOI 0,01 o 0,001 UFP/célula. Los resultados muestran que IBDV tiene menor capacidad replicativa al ser inoculado en MOIs elevadas. Se ha descrito en ciertos virus que las infecciones con elevada MOI conllevan una mayor producción de DVGs capaces de formar DIPs¹⁶³, hay datos consistentes con Ebola¹³⁰ o virus respiratorio sincitial¹⁶⁴, entre otros. En el caso concreto de IBDV podría estar

ocurriendo un fenómeno similar. Gracias a los análisis de secuenciación de RNA, se ha observado que cuanto más IBDV se inoculan al inicio de la infección mayor proporción de lecturas aberrantes aparecen al mismo tiempo p.i. La proporción de lecturas aberrantes (las cuales relacionamos con DVGs) con respecto a lecturas completas obtenidas a MOI 100 UFP/célula es muy superior a la obtenida a MOI 0,1 UFP/célula. Los DVGs producidos se acumularían en el citoplasma celular, provocando una disminución de la replicación de genomas completos y la consiguiente menor producción de proteínas virales y de progenie viral infectiva.

La heterogeneidad fenotípica célula-célula observada en la infección es dependiente de la cantidad de virus inicial, mientras que con una MOI inicial alta de 10 o 100 UFP/célula el fenotipo punteado es el más habitual, a medida que descendemos la MOI van apareciendo células que presentan una mayor carga viral. En una infección a MOI de 100 UFP/célula de IBDV la acumulación de DVGs se produce a mayor velocidad interfiriendo con la replicación tan rápido que el virus es prácticamente incapaz de replicar, sin embargo, a MOI 0,1 UFP/célula la aparición de DVGs es más lenta y en menor proporción por lo que prácticamente no afecta a la replicación de IBDV.

4.1.3 El equilibrio encontrado entre DVGs y virus infectivo en células persistentes impide la replicación de nuevo IBDV.

Las células DF-1P no pueden ser re-infectadas por ninguna cepa de IBDV, los resultados obtenidos en los análisis de estas infecciones muestran niveles de producción viral idénticos a los obtenidos en las DF-1P sin re-infectar. Por otro lado, al realizar re-infecciones de esta línea celular con otros virus RNA (Reovirus, VSV-GFP y SFV-GFP) observamos efecto citopático y producción de nuevas proteínas virales en todas las infecciones. La presencia de DVGs en las células persistentes es una muy posible explicación para este fenómeno. Los DVGs se acumulan en el citoplasma celular de algunas células consiguiendo un equilibrio entre la replicación de los DG y de genomas completos, dando lugar al establecimiento de la infección persistente que conlleva unos bajos niveles de proteínas virales funcionales, ya que, los niveles de segmentos completos que puedan dar lugar a RNAm que las expresa son irrisorios¹²⁴. El hecho de que las células persistentes no puedan ser re-infectadas por IBDV, pero sí por otros virus, coincide con la hipótesis anterior. Cuando se infectan células persistentes, éstas ya contienen en su interior una gran cantidad de DVGs que se encuentran en equilibrio con el escaso virus infectivo, la inoculación de nuevo virus provoca un ligero cambio en la dinámica celular que enseguida revierte y vuelve el equilibrio pre-infección. Los DVGs impedirían la propagación del nuevo virus infectivo. Al no poder replicar, la entrada del nuevo virus no conlleva un aumento de proteínas

virales, por lo que únicamente somos capaces de detectar la proteína viral ya presente en la célula antes de la infección. Los DVGs por su parte no suponen ningún impedimento para el resto de virus, así que estos pueden replicar con total libertad y naturalidad.

4.1.4 DVGs de IBDV y su interacción con las rutas de señalización celulares.

Como se ha comentado anteriormente en este trabajo, una gran cantidad de los DVGs descritos en otros virus tienen la capacidad de interferir con la replicación viral utilizando diferentes procedimientos e interactuando con diferentes mecanismos celulares. Los DVGs y DIPs son capaces de activar la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa, hecho que ocurre, por ejemplo, con el virus del Sendai^{165,166}. Además, estos DG son capaces de interferir con el ciclo replicativo viral a diferentes niveles: los DIPs pueden influir a nivel de adsorción y penetración, pudiendo llevar a la atenuación de la enfermedad causada por el virus Dengue¹⁶⁷, son capaces, también, de interferir con la correcta replicación viral¹²³ y con la encapsidación de partículas virales^{168,169}. Con los resultados obtenidos, y sabiendo que al igual que se produce una menor replicación viral también encontramos menor muerte celular, se podría pensar que también se produce algún bloqueo de las rutas de muerte celular o activación de las rutas de supervivencia que favorecen la entrada de la célula en persistencia. En el ensayo de secuenciación de RNA se ha observado que la proteína TRAF-1 se encuentra sobre-expresada en extractos celulares en los que hay una proporción mayor de lecturas defectivas. Esta proteína está implicada tanto en rutas de pro-supervivencia como en rutas antivirales. En el caso de SeV se ha visto que al ruta en la que interfiere TRAF-1 está relacionado con activación de rutas de pro-supervivencia en células con elevadas cantidades de DVGs¹³⁸.

5. Establecimiento de infecciones persistentes por parte de IBDV.

En base a los datos obtenidos y presentados en este trabajo se puede crear un modelo hipotético sobre cómo se establecen las infecciones persistentes por parte de IBDV. Cuando se produce una infección aguda por IBDV pueden darse varios acontecimientos y, dependiendo de la cantidad de virus que inoculamos y de las características celulares, desarrollarse situaciones que desencadenan en una infección persistente. Una vez se ha producido la entrada del virus por macropinocitosis y ha sido liberado el material genético al citoplasma, comienza la replicación viral, replicación que se ha demostrado que siempre genera DVGs. En este momento, dentro del citoplasma se encuentra un gran número de secuencias virales, tanto completas como defectivas, que comienzan a replicar, produciéndose una competición por la RdRp, los nucleótidos y las proteínas virales. Cuando la replicación de segmentos completos capaces de generar virus infectivo se produce sin interferencias, se genera un elevado número de progenie infectiva y las

células productoras acaban muriendo, mayoritariamente por la apoptosis derivada de la cascada de señalización dependiente de IFN. Cuando esta ruta de señalización dependiente de IFN se encuentra trunca y/o no funciona correctamente, como es el caso de las células DF-1PC, la muerte celular es significativamente menor, permitiendo que el proceso replicativo de IBDV sea más largo y favoreciendo de esta manera la acumulación de DVGs. Cuando la replicación de segmentos defectivos es alta, éstos comienzan a aumentar proporcionalmente con respecto a los genomas completos. El aumento de genomas defectuosos provoca la disminución en la cantidad de RNAm viral, y por lo tanto de proteínas virales, provocando una drástica disminución en la cantidad de virus infectivo y retrasando la lisis/apoptosis celular. Dentro de la monocapa encontramos cierta diversidad, la acumulación de DVGs no ocurre en todas las células infectadas, en la mayoría de ellas la producción de virus infectivo es muy elevada y acaban sufriendo apoptosis. La cantidad de células en las que se produce uno u otro fenómeno depende de varios factores, el primero es la cantidad viral inoculada y la capacidad de generación de DVG y la segunda es la resistencia a la apoptosis inducida por IFN. En el caso de las células DF-1PC que no son capaces de expresar IFNAR-2 la muerte celular es menor, permitiendo a los DVG acumularse en el citoplasma celular hasta alcanzar el equilibrio que da lugar a la infección persistente. En cualquiera de los casos, al final del proceso de infección se consigue un equilibrio entre virus infectivo, DVGs y apoptosis celular que llevan a las células al establecimiento de una infección persistente y, con el tiempo, una línea persistentemente infectada y estable. Un posible modelo sobre el establecimiento de la persistencia aparece representado en la **figura 34**.

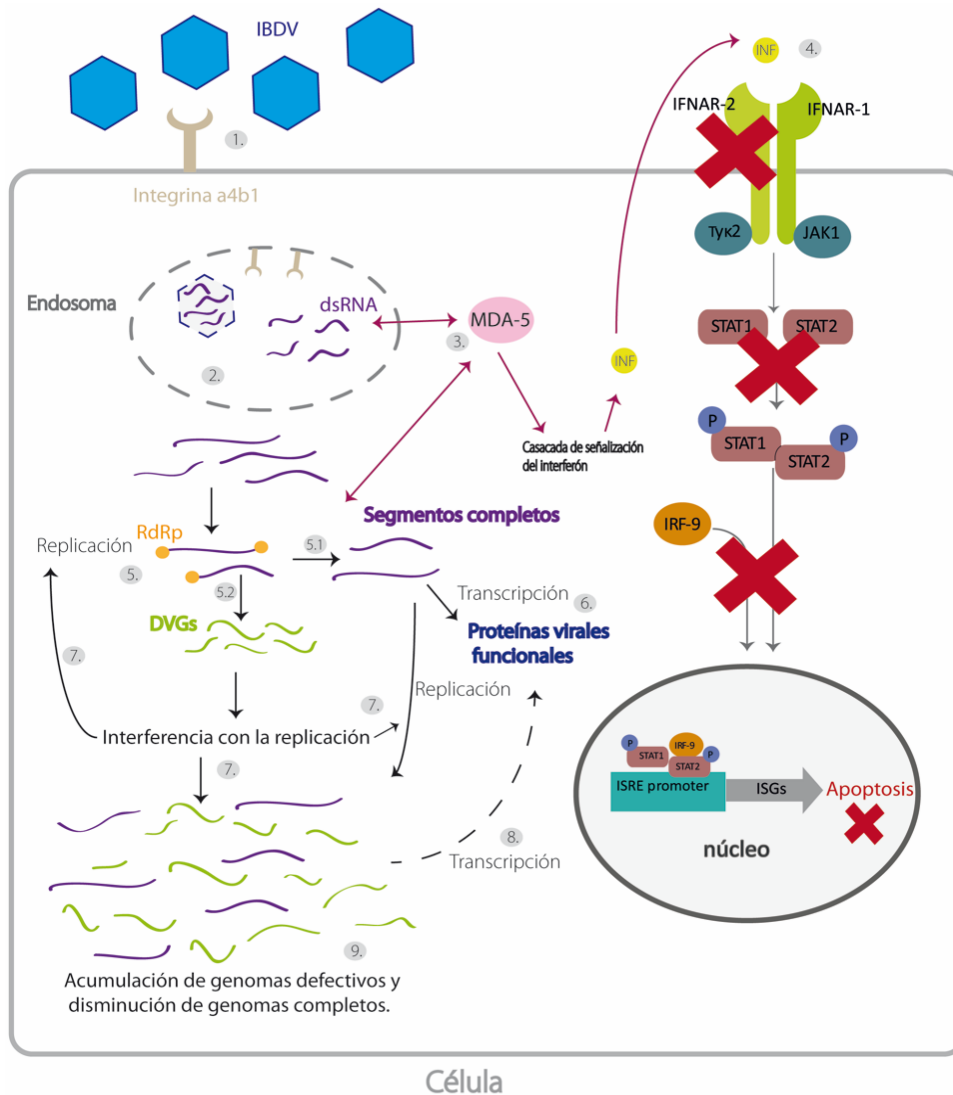


Figura 34. Posible modelo del establecimiento de infecciones persistentes por parte de IBDV. 1. Entrada de IBDV en la célula gracias a la interacción con el receptor chHSP90. 2. Internalización en endosomas y liberación del material genético al citoplasma celular. 3. Interacción de MDA-5 con el dsRNA y activación de la cascada de señalización antiviral. Expresión de INF. 4. Interacción de IFN con el receptor formado por IFNAR-1 e IFNAR-2 y desencadenamiento de la cascada de señalización dando lugar a la activación de ISGs, caspasas y la consiguiente apoptosis. En el caso de células DF-1PC no se desencadena la respuesta, el receptor IFNAR-2 no se expresa de forma funcional, por lo que no se produce la activación de la apoptosis por esta vía. 5. Replicación de genoma viral gracias a la RdRp dando lugar a segmentos completos (5.1) y DVGs (5.2). 6. Transcripción del mRNA viral procedente de segmentos completos y producción de proteínas virales funcionales. 7. Los DVGs producidos comienzan a interferir con la correcta replicación de segmentos completos y se comienzan a acumular en el citoplasma. 8. Los pocos segmentos completos restantes son capaces de transcribir proteínas funcionales, pero en muy baja cantidad. La baja cantidad de virus infeccioso provoca la ausencia de apoptosis derivada de la infección aguda. 9. La célula se mantiene con vida y la replicación viral llega a un equilibrio entre DVGs y segmentos completos; se establece la infección persistente.

CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado una metodología que permite la obtención de cultivos celulares estables infectados persistentemente con IBDV a partir de líneas celulares de pollo, codorniz y humanas.
2. Las poblaciones virales aisladas a partir de células infectadas persistentemente mantienen una capacidad de replicación similar a la del virus parental. Por otra parte, no se han detectado alteraciones significativas en el genoma de estas poblaciones.
3. El establecimiento de la persistencia en células aviares DF-1 está directamente relacionado con la inactivación genética de la ruta de señalización de interferón de tipo I lo que provoca una drástica reducción de la respuesta apoptótica inducida por la infección.
4. Los resultados obtenidos con células DF-1 han sido confirmados con células HeLa carentes del gen que codifica la subunidad 2 del receptor de interferón α/β . Estos resultados sugieren que el bloqueo de la respuesta a interferón de tipo I es un factor primordial para el establecimiento de infecciones persistentes de IBDV independientemente del tipo celular analizado.
5. Tanto la actividad replicativa como la progenie viral de IBDV en células infectadas persistentemente son muy inferiores a las detectadas en células infectadas de forma aguda lo que sugiere la existencia de algún factor(es) que atenúan la replicación viral durante la persistencia.
6. Las células DF-1 infectadas persistentemente con IBDV son susceptibles a la infección con virus con diferentes genomas RNA. Sin embargo, son totalmente resistentes a la super-infección con IBDV.
7. Los datos experimentales descritos en esta memoria sugieren que la reducción de la actividad replicativa y la resistencia a la super-infección con IBDV podrían deberse a la generación y acumulación de genomas virales defectivos. Estos genomas parecen estar también implicados en la modulación de la replicación viral durante la infección aguda.
8. El establecimiento de infecciones persistentes por parte de IBDV tiene lugar cuando se producen simultáneamente dos fenómenos: i) disminución de la capacidad replicativa del virus; y ii) reducción de la respuesta innata y consiguiente apoptosis celular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cosgrove, A. S. An Apparently New Disease of Chickens: Avian Nephrosis. *Avian Dis.* **6**, (1962).
2. International Committee on Taxonomy of Viruses. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (2012).
3. von Einem, U. I. *et al.* VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* (2004). doi:10.1099/vir.0.19772-0
4. Luque, D. *et al.* Infectious Bursal Disease Virus: Ribonucleoprotein Complexes of a Double-Stranded RNA Virus. *J. Mol. Biol.* (2009). doi:10.1016/j.jmb.2008.11.029
5. Mundt, E., Köllner, B. & Kretzschmar, D. VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture. *J. Virol.* **71**, (1997).
6. Méndez, F., De Garay, T., Rodríguez, D. & Rodríguez, J. F. Infectious bursal disease virus VP5 Polypeptide: A phosphoinositide-binding protein required for efficient cell-to-cell virus dissemination. *PLoS One* (2015). doi:10.1371/journal.pone.0123470
7. Qin, L. *et al.* VP5-deficient mutant virus induced protection against challenge with very virulent infectious bursal disease virus of chickens. *Vaccine* **28**, (2010).
8. Sánchez, A. B. & Rodríguez, J. F. Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: Identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology* (1999). doi:10.1006/viro.1999.9910
9. Birghan, C., Mundt, E. & Gorbalenya, A. E. A non-canonical Lon proteinase lacking the ATPase domain employs the Ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. *EMBO J.* **19**, (2000).
10. Feldman, A. R., Lee, J., Delmas, B. & Paetzel, M. Crystal Structure of a Novel Viral Protease with a Serine/Lysine Catalytic Dyad Mechanism. *J. Mol. Biol.* **358**, (2006).
11. Lejal, N., Costa, B. Da, Huet, J. C. & Delmas, B. Role of Ser-652 and Lys-692 in the protease activity of infectious bursal disease virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites. *J. Gen. Virol.* **81**, (2000).
12. Irigoyen, N. *et al.* Autoproteolytic activity derived from the infectious bursal disease virus capsid protein. *J. Biol. Chem.* **284**, (2009).
13. Maraver, A. *et al.* The Oligomerization Domain of VP3, the Scaffolding Protein of Infectious Bursal Disease Virus, Plays a Critical Role in Capsid Assembly. *J. Virol.* (2003). doi:10.1128/jvi.77.11.6438-6449.2003
14. Busnadiego, I., Maestre, A. M., Rodríguez, D. & Rodríguez, J. F. The Infectious Bursal Disease Virus RNA-Binding VP3 Polypeptide Inhibits PKR-Mediated Apoptosis. *PLoS One* **7**, (2012).
15. Valli, A. *et al.* The VP3 Factor from Viruses of Birnaviridae Family Suppresses RNA Silencing by Binding Both Long and Small RNA Duplexes. *PLoS One* (2012).

doi:10.1371/journal.pone.0045957

16. Ye, C. *et al.* Inhibition of Antiviral Innate Immunity by Birnavirus VP3 Protein via Blockage of Viral Double-Stranded RNA Binding to the Host Cytoplasmic RNA Detector MDA5. *J. Virol.* (2014). doi:10.1128/jvi.01115-14
17. Garriga, D. *et al.* Activation mechanism of a noncanonical RNA-dependent RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2007). doi:10.1073/pnas.0704447104
18. Ferrero, D., Garriga, D., Navarro, A., Rodríguez, J. F. & Verdager, N. Infectious Bursal Disease Virus VP3 Upregulates VP1-Mediated RNA-Dependent RNA Replication. *J. Virol.* (2015). doi:10.1128/jvi.00218-15
19. Böttcher, B. *et al.* Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J. Virol.* (1997).
20. Martinez-Torrecedrada, J. L. *et al.* Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology* **278**, (2000).
21. Luque, D. *et al.* Infectious bursal disease virus is an icosahedral polyploid dsRNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, (2009).
22. Lago, M., Rodríguez, J. F., Bandén, I. & Dopazo, C. P. Aquabirnavirus polyploidy: A new strategy to modulate virulence? *J. Gen. Virol.* **97**, (2016).
23. Ingraio, F., Rauw, F., Lambrecht, B. & van den Berg, T. Infectious Bursal Disease: a complex host-pathogen interaction. *Dev. Comp. Immunol.* **41**, 429–438 (2013).
24. Graziosi, G., Catelli, E., Fanelli, A. & Lupini, C. Infectious bursal disease virus in free-living wild birds: A systematic review and meta-analysis of its sero-viroprevalence on a global scale. *Transbound. Emerg. Dis.* (2021). doi:10.1111/TBED.14433
25. McFerran, J. B. *et al.* Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks: Demonstration of a second serotype. *Avian Pathol.* (1980). doi:10.1080/03079458008418423
26. Jackwood, D. H. & Saif, Y. M. Antigenic diversity of infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.* **31**, (1987).
27. Chettle, N., Stuart, J. C. & Wyeth, P. J. Outbreak of virulent infectious bursal disease in East Anglia. *Vet. Rec.* **125**, (1989).
28. Nunoya, T., Otaki, Y., Tajima, M., Hiraga, M. & Saito, T. Occurrence of acute infectious bursal disease with high mortality in Japan and pathogenicity of field isolates in specific-pathogen-free chickens. *Avian Dis.* **36**, (1992).
29. Van Den Berg, T. P., Gonze, M. & Meulemans, G. Acute infectious bursal disease in poultry: Isolation and characterisation of a highly virulent strain. *Avian Pathol.* **20**, (1991).
30. Inoue, M., Yamamoto, H., Matuo, K. & Hihara, H. Susceptibility of Chicken Monocytic Cell Lines to Infectious Bursal Disease Virus. *J. Vet. Med. Sci.* **54**, (1992).

31. Hiraga, M. *et al.* Pathogenesis of Highly Virulent Infectious Bursal Disease Virus Infection in Intact and Bursectomized Chickens. *J. Vet. Med. Sci.* **56**, (1994).
32. Aricibasi, M., Jung, A., Heller, E. D. & Rautenschlein, S. Differences in genetic background influence the induction of innate and acquired immune responses in chickens depending on the virulence of the infecting infectious bursal disease virus (IBDV) strain. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **135**, (2010).
33. Becht, H. Infectious bursal disease virus. *Current topics in microbiology and immunology* (1980). doi:10.1007/978-3-642-67717-5_5
34. Van Den Berg, T. P., Etteradossi, N., Toquin, D. & Meulemans, G. Infectious bursal disease (Gumboro disease). *OIE Rev. Sci. Tech.* (2000). doi:10.46784/e-avm.v1i1.219
35. Sharma, J. M., Kim, I. J., Rautenschlein, S. & Yeh, H. Y. Infectious bursal disease virus of chickens: Pathogenesis and immunosuppression. *Dev. Comp. Immunol.* **24**, (2000).
36. Müller, H., Mundt, E., Etteradossi, N. & Islam, M. R. Current status of vaccines against infectious bursal disease. *Avian Pathol.* **41**, (2012).
37. Fan, L. *et al.* Novel variant strains of infectious bursal disease virus isolated in China. *Vet. Microbiol.* **230**, (2019).
38. Piłkuła, A., Śmietanka, K. & Perez, L. J. Emergence and expansion of novel pathogenic reassortant strains of infectious bursal disease virus causing acute outbreaks of the disease in Europe. *Transbound. Emerg. Dis.* **67**, (2020).
39. Yang, H. & Ye, C. Reverse genetics approaches for live-attenuated vaccine development of infectious bursal disease virus. *Current Opinion in Virology* **44**, (2020).
40. Ignjatovic, J., Gould, G., Trinidad, L. & Sapats, S. Chicken recombinant antibodies against infectious bursal disease virus are able to form antibody-virus immune complex. *Avian Pathol.* **35**, (2006).
41. Chi, J. *et al.* Surface IgM λ light chain is involved in the binding and infection of infectious bursal disease virus (IBDV) to DT40 cells. *Virus Genes* **54**, (2018).
42. Lin, T.-W. *et al.* Chicken Heat Shock Protein 90 Is a Component of the Putative Cellular Receptor Complex of Infectious Bursal Disease Virus. *J. Virol.* **81**, (2007).
43. Delgui, L. *et al.* The capsid protein of infectious bursal disease virus contains a functional $\alpha 4\beta 1$ integrin ligand motif. *Virology* **386**, (2009).
44. Ren, X. *et al.* Binding chicken Anx2 is beneficial for infection with infectious bursal disease virus. *Virus Res.* **210**, (2015).
45. Gimenez, M. C., Rodríguez Aguirre, J. F., Colombo, M. I. & Delgui, L. R. Infectious bursal disease virus uptake involves macropinocytosis and trafficking to early endosomes in a Rab5-dependent manner. *Cell. Microbiol.* **17**, (2015).
46. Galloux, M. *et al.* NMR structure of a viral peptide inserted in artificial membranes: A view on the early steps of the birnavirus entry process. *J. Biol. Chem.* **285**, (2010).

47. Dalton, R. M. & Rodríguez, J. F. Rescue of infectious birnavirus from recombinant ribonucleoprotein complexes. *PLoS One* **9**, (2014).
48. Delgui, L. R., Rodríguez, J. F. & Colombo, M. I. The Endosomal Pathway and the Golgi Complex Are Involved in the Infectious Bursal Disease Virus Life Cycle. *J. Virol.* **87**, (2013).
49. Méndez, F. *et al.* Non-lytic egression of infectious bursal disease virus (IBDV) particles from infected cells. *PLoS One* **12**, (2017).
50. Boot, H. J. Modifications of the 3'-UTR stem-loop of infectious bursal disease virus are allowed without influencing replication or virulence. *Nucleic Acids Res.* **32**, 211–222 (2004).
51. Zheng, S. J. Infectious Bursal Disease Virus. in *Avian Virology: Current Research and Future Trends* (Caister Academic Press, 2019). doi:10.21775/9781912530106.07
52. Barber, G. N. Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death and Differentiation* **8**, (2001).
53. Meier, P., Finch, A. & Evan, G. Apoptosis in development. *Nature* **407**, (2000).
54. Van Cruchten, S. & Van den Broeck, W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat. Histol. Embryol.* **31**, (2002).
55. Vasconcelos, A. C. & Lam, K. M. Apoptosis induced by infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.* **75**, (1994).
56. Lam, K. M. Morphological evidence of apoptosis in chickens infected with infectious bursal disease virus. *J. Comp. Pathol.* **116**, (1997).
57. Vasconcelos, A. C. & Lam, K. M. Apoptosis in chicken embryos induced by the infectious bursal disease virus. *J. Comp. Pathol.* **112**, (1995).
58. Ojeda, F., Skardova, I., Guarda, M. I., Ulloa, J. & Folch, H. Proliferation and apoptosis in infection with infectious bursal disease virus: A flow cytometric study. *Avian Dis.* **41**, (1997).
59. Nieper, H., Teifke, J. P., Jungmann, A., Löhr, C. V. & Müller, H. Infected and apoptotic cells in the IBDV-infected bursa of Fabricius, studied by double-labelling techniques. *Avian Pathol.* **28**, (1999).
60. Cubas-Gaona, L. L., Diaz-Beneitez, E., Ciscar, M., Rodríguez, J. F. & Rodríguez, D. Exacerbated Apoptosis of Cells Infected with Infectious Bursal Disease Virus upon Exposure to Interferon Alpha. *J. Virol.* **92**, (2018).
61. Riera Romo, M., Pérez-Martínez, D. & Castillo Ferrer, C. Innate immunity in vertebrates: An overview. *Immunology* **148**, (2016).
62. Schneider, W. M., Chevillotte, M. D. & Rice, C. M. Interferon-stimulated genes: A complex web of host defenses. *Annual Review of Immunology* **32**, (2014).
63. Galani, I. E., Koltsida, O. & Andreakos, E. Type III interferons (IFNs): Emerging master

- regulators of immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.* **850**, (2015).
64. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* **140**, (2010).
 65. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nature Immunology* **11**, (2010).
 66. Matsumiya, T. & Stafforini, D. M. Function and regulation of retinoic acid-inducible gene-1. *Critical Reviews in Immunology* **30**, (2010).
 67. Zinzula, L. & Tramontano, E. Strategies of highly pathogenic RNA viruses to block dsRNA detection by RIG-I-like receptors: Hide, mask, hit. *Antiviral Research* **100**, (2013).
 68. Liniger, M., Summerfield, A., Zimmer, G., McCullough, K. C. & Ruggli, N. Chicken Cells Sense Influenza A Virus Infection through MDA5 and CARDIF Signaling Involving LGP2. *J. Virol.* **86**, (2012).
 69. Aaronson, D. S. & Horvath, C. M. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* **296**, (2002).
 70. Murray, P. J. The JAK-STAT Signaling Pathway: Input and Output Integration. *J. Immunol.* **178**, (2007).
 71. Patel, R. C. & Sen, G. C. PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR. *EMBO J.* **17**, (1998).
 72. Balachandran, S. *et al.* Alpha/Beta Interferons Potentiate Virus-Induced Apoptosis through Activation of the FADD/Caspase-8 Death Signaling Pathway. *J. Virol.* **74**, (2000).
 73. Gil, J., García, M. A. & Esteban, M. Caspase 9 activation by the dsRNA-dependent protein kinase, PKR: Molecular mechanism and relevance. *FEBS Lett.* **529**, (2002).
 74. Silverman, R. H. Viral Encounters with 2',5'-Oligoadenylate Synthetase and RNase L during the Interferon Antiviral Response. *J. Virol.* **81**, (2007).
 75. Ponten, A., Sick, C., Weeber, M., Haller, O. & Kochs, G. Dominant-negative mutants of human MxA protein: domains in the carboxy-terminal moiety are important for oligomerization and antiviral activity. *J. Virol.* **71**, (1997).
 76. Lee, C. C., Wu, C. C. & Lin, T. L. Chicken melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) recognizes infectious bursal disease virus infection and triggers MDA5-related innate immunity. *Arch. Virol.* (2014). doi:10.1007/s00705-014-1983-9
 77. Zhang, W. X. *et al.* Promoter structures and differential responses to viral and non-viral inducers of chicken melanoma differentiation-associated gene 5. *Mol. Immunol.* **76**, (2016).
 78. He, X., Chen, Y., Kang, S., Chen, G. & Wei, P. Differential Regulation of chTLR3 by Infectious Bursal Disease Viruses with Different Virulence in Vitro and in Vivo. *Viral Immunol.* **30**, (2017).

79. Wei, L. *et al.* Infectious bursal disease virus activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway by interaction of VP5 protein with the p85 α subunit of PI3K. *Virology* **417**, (2011).
80. Li, Z. *et al.* Critical Role for Voltage-Dependent Anion Channel 2 in Infectious Bursal Disease Virus-Induced Apoptosis in Host Cells via Interaction with VP5. *J. Virol.* **86**, (2012).
81. Qin, Y. *et al.* VP2 of infectious bursal disease virus induces apoptosis via triggering oral cancer overexpressed 1 (ORAOV1) protein degradation. *Front. Microbiol.* **8**, (2017).
82. Decman, V., Freeman, M. L., Kinchington, P. R. & Hendricks, R. L. Immune control of HSV-1 latency. *Viral Immunology* **18**, (2005).
83. Efstathiou, S. & Preston, C. M. Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency. *Virus Research* **111**, (2005).
84. Rawls, W. E., Chan, M. A. & Gee, S. R. Mechanisms of persistence in arenavirus infections: A brief review. *Canadian Journal of Microbiology* **27**, (1981).
85. Jamali, G. M., Jamali, A. A. & Shaikh, H. HEPATITIS C VIRUS; *Prof. Med. J.* **24**, 1621–1629 (2017).
86. MacDonald, R. D. & Kennedy, J. C. Infectious pancreatic necrosis virus persistently infects Chinook Salmon embryo cells independent of interferon. *Virology* **95**, (1979).
87. Rijji John, K. & Richards, R. H. Characteristics of a new birnavirus associated with a warm-water fish cell line. *J. Gen. Virol.* **80**, (1999).
88. Van Cleef, K. W. R. *et al.* Mosquito and Drosophila entomobirnaviruses suppress dsRNA- and siRNA-induced RNAi. *Nucleic Acids Res.* **42**, (2014).
89. Abdel-Alim, G. A. & Saif, Y. M. Detection and persistence of infectious bursal disease virus in specific-pathogen-free and commercial broiler chickens. *Avian Dis.* **45**, (2001).
90. Elankumaran, S., Heckert, R. A. & Moura, L. Pathogenesis and tissue distribution of a variant strain of infectious bursal disease virus in commercial broiler chickens. *Avian Dis.* **46**, (2002).
91. Abdul, R., Murgia, M. V., Rodriguez-Palacios, A., Lee, C. W. & Saif, Y. M. Persistence and tissue distribution of infectious bursal disease virus in experimentally infected spf and commercial broiler chickens. *Avian Dis.* **57**, (2013).
92. Delgui, L., González, D. & Rodríguez, J. F. Infectious bursal disease virus persistently infects bursal B-lymphoid DT40 cells. *J. Gen. Virol.* **90**, 1148–1152 (2009).
93. Baba, T. W., Giroir, B. P. & Humphries, E. H. Cell lines derived from avian lymphomas exhibit two distinct phenotypes. *Virology* **144**, (1985).
94. Oldstone, M. B. A. Anatomy of viral persistence. *PLoS Pathogens* **5**, (2009).
95. Knipe, D. M. & Cliffe, A. Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent

- infection. *Nature Reviews Microbiology* **6**, (2008).
96. Shepard, C. W., Finelli, L. & Alter, M. J. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infectious Diseases* **5**, (2005).
 97. Gregory, C. D. *et al.* Activation of Epstein-Barr virus latent genes protects human B cells from death by apoptosis. *Nature* **349**, (1991).
 98. Loh, J. *et al.* A surface groove essential for viral Bcl-2 function during chronic infection in vivo. *PLoS Pathog.* **1**, (2005).
 99. Deng, L. *et al.* NS3 protein of hepatitis C virus associates with the tumour suppressor p53 and inhibits its function in an NS3 sequence-dependent manner. *J. Gen. Virol.* **87**, (2006).
 100. Klase, Z. *et al.* HIV-1 TAR miRNA protects against apoptosis by altering cellular gene expression. *Retrovirology* **6**, (2009).
 101. Virgin, H. W., Wherry, E. J. & Ahmed, R. Redefining Chronic Viral Infection. *Cell* **138**, (2009).
 102. Huang, A. S. & Baltimore, D. Defective Viral Particles and Viral Disease Processes. *Nature* **226**, (1970).
 103. Noppornpanth, S. *et al.* Characterization of hepatitis C virus deletion mutants circulating in chronically infected patients. *J. Virol.* **81**, 12496–12503 (2007).
 104. Aaskov, J., Buzacott, K., Thu, H. M., Lowry, K. & Holmes, E. C. Long-term transmission of defective RNA viruses in humans and *Aedes* mosquitoes. *Science* **311**, 236–238 (2006).
 105. Saira, K. *et al.* Sequence analysis of in vivo defective interfering-like RNA of influenza A H1N1 pandemic virus. *J. Virol.* **87**, 8064–8074 (2013).
 106. Jaworski, E. & Routh, A. Parallel ClickSeq and Nanopore sequencing elucidates the rapid evolution of defective-interfering RNAs in Flock House virus. *PLoS Pathog.* **13**, (2017).
 107. Sun, Y. *et al.* A specific sequence in the genome of respiratory syncytial virus regulates the generation of copy-back defective viral genomes. *PLoS Pathog.* **15**, (2019).
 108. Poirier, E. Z. *et al.* Low-Fidelity Polymerases of Alphaviruses Recombine at Higher Rates To Overproduce Defective Interfering Particles. *J. Virol.* **90**, 2446–2454 (2015).
 109. Fodor, E., Mingay, L. J., Crow, M., Deng, T. & Brownlee, G. G. A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase promotes the generation of defective interfering RNAs. *J. Virol.* **77**, 5017–5020 (2003).
 110. Pfaller, C. K. *et al.* Measles Virus Defective Interfering RNAs Are Generated Frequently and Early in the Absence of C Protein and Can Be Destabilized by Adenosine Deaminase Acting on RNA-1-Like Hypermutations. *J. Virol.* **89**, (2015).
 111. Sánchez-Aparicio, M. T. *et al.* Loss of Sendai virus C protein leads to accumulation of RIG-I immunostimulatory defective interfering RNA. *J. Gen. Virol.* **98**, (2017).
 112. Odagiri, T. & Tobita, K. Mutation in NS2, a nonstructural protein of influenza A virus,

- extragenetically causes aberrant replication and expression of the PA gene and leads to generation of defective interfering particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, (1990).
113. Nomoto, A., Jacobson, A., Lee, Y. F., Dunn, J. & Wimmer, E. Defective interfering particles of poliovirus: Mapping of the deletion and evidence that the deletions in the genomes of DI(1), (2) and (3) are located in the same region. *J. Mol. Biol.* **128**, (1979).
 114. Perrault, J. & Semler, B. L. Internal genome deletions in two distinct classes of defective interfering particles of vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, (1979).
 115. Davis, A. R., Hiti, A. L. & Nayak, D. P. Influenza defective interfering viral RNA is formed by internal deletion of genomic RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, (1980).
 116. O'Hara, P. J., Nichol, S. T., Horodyski, F. M. & Holland, J. J. Vesicular stomatitis virus defective interfering particles can contain extensive genomic sequence rearrangements and base substitutions. *Cell* **36**, (1984).
 117. Hillman, B. I., Carrington, J. C. & Morris, T. J. A defective interfering RNA that contains a mosaic of a plant virus genome. *Cell* **51**, (1987).
 118. Kolakofsky, D. Isolation and characterization of Sendai virus DI-RNAs. *Cell* **8**, (1976).
 119. Perales, C., Mateo, R., Mateu, M. G. & Domingo, E. Insights into RNA Virus Mutant Spectrum and Lethal Mutagenesis Events: Replicative Interference and Complementation by Multiple Point Mutants. *J. Mol. Biol.* **369**, (2007).
 120. Cattaneo, R. *et al.* Biased hypermutation and other genetic changes in defective measles viruses in human brain infections. *Cell* **55**, (1988).
 121. Lazzarini, R. A., Keene, J. D. & Schubert, M. The origins of defective interfering particles of the negative-strand RNA viruses. *Cell* **26**, (1981).
 122. Nichol, S. T., O'Hara, P. J., Holland, J. J. & Perrault, J. Structure and origin of a novel class of defective interfering particle of vesicular stomatitis virus. *Nucleic Acids Res.* **12**, (1984).
 123. Portner, A. & Kingsbury, D. W. Homologous Interference by Incomplete Sendai Virus Particles: Changes in Virus-Specific Ribonucleic Acid Synthesis. *J. Virol.* **8**, (1971).
 124. Vignuzzi, M. & López, C. B. Defective viral genomes are key drivers of the virus-host interaction. *Nat. Microbiol.* **4**, 1075–1087 (2019).
 125. Wang, C. *et al.* Cell-to-cell variation in defective virus expression and effects on host responses during influenza virus infection. *MBio* **11**, (2020).
 126. Fuller, F. J. & Marcus, P. I. Interferon induction by viruses. IV. Sindbis virus: early passage defective-interfering particles induce interferon. *J. Gen. Virol.* **48**, (1980).
 127. Sun, Y. *et al.* Immunostimulatory Defective Viral Genomes from Respiratory Syncytial Virus Promote a Strong Innate Antiviral Response during Infection in Mice and Humans. *PLoS Pathog.* **11**, e1005122 (2015).

128. Shivakoti, R., Siwek, M., Hauer, D., Schultz, K. L. W. & Griffin, D. E. Induction of Dendritic Cell Production of Type I and Type III Interferons by Wild-Type and Vaccine Strains of Measles Virus: Role of Defective Interfering RNAs. *J. Virol.* **87**, (2013).
129. Roux, L. & Holland, J. J. Role of defective interfering particles of Sendai virus in persistent infections. *Virology* **93**, 91–103 (1979).
130. Calain, P., Monroe, M. C. & Nichol, S. T. Ebola virus defective interfering particles and persistent infection. *Virology* **262**, 114–128 (1999).
131. Huang, A. S. & Wagner, R. R. Defective T particles of vesicular stomatitis virus. II. Biologic role in homologous interference. *Virology* **30**, 173–181 (1966).
132. Lehmann-Grube, F., Slenczka, W. & Tees, R. A persistent and inapparent infection of L cells with the virus of lymphocytic choriomeningitis. *J. Gen. Virol.* **5**, 63–81 (1969).
133. Schmaljohn, C. & Blair, C. D. Persistent infection of cultured mammalian cells by Japanese encephalitis virus. *J. Virol.* **24**, 580–589 (1977).
134. Popescu, M. & Lehmann-Grube, F. Defective interfering particles in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* **77**, (1977).
135. Baczko, K. *et al.* Expression of defective measles virus genes in brain tissues of patients with subacute sclerosing panencephalitis. *J. Virol.* **59**, (1986).
136. Frensing, T. *et al.* Continuous Influenza Virus Production in Cell Culture Shows a Periodic Accumulation of Defective Interfering Particles. *PLoS One* **8**, (2013).
137. Genoyer, E. & López, C. B. Defective Viral Genomes Alter How Sendai Virus Interacts with Cellular Trafficking Machinery, Leading to Heterogeneity in the Production of Viral Particles among Infected Cells. *J. Virol.* **93**, (2019).
138. Xu, J. *et al.* Replication defective viral genomes exploit a cellular pro-survival mechanism to establish paramyxovirus persistence. *Nat. Commun.* **8**, 799 (2017).
139. Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* **96**, (1990).
140. Ostertag, D., Hoblitzell-Ostertag, T. M. & Perrault, J. Overproduction of Double-Stranded RNA in Vesicular Stomatitis Virus-Infected Cells Activates a Constitutive Cell-Type-Specific Antiviral Response. *J. Virol.* **81**, (2007).
141. *Virology Methods Manual*. *Virology Methods Manual* (1996). doi:10.1016/b978-0-12-465330-6.x5000-3
142. Soubies, S. M. *et al.* Identification of a European interserotypic reassortant strain of infectious bursal disease virus. *Avian Pathol.* **46**, (2017).
143. Patel, R. K. & Jain, M. NGS QC toolkit: A toolkit for quality control of next generation sequencing data. *PLoS One* **7**, (2012).
144. Langmead, B. & Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods*

- 9, (2012).
145. Team, R. C. R: A language and environment for statistical computing v. 3.6. 1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2019). *Sci. Rep.* **11**, (2021).
 146. Dobin, A. *et al.* STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, (2013).
 147. Beauclair, G. *et al.* DI-tector: Defective interfering viral genomes' detector for next-generation sequencing data. *RNA* **24**, (2018).
 148. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, (1990).
 149. Kim, D. & Oh, H. S. EMD: A package for empirical mode decomposition and hilbert spectrum. *R J.* **1**, (2009).
 150. Zmurko, J. *et al.* The Viral Polymerase Inhibitor 7-Deaza-2'-C-Methyladenosine Is a Potent Inhibitor of In Vitro Zika Virus Replication and Delays Disease Progression in a Robust Mouse Infection Model. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, (2016).
 151. Santhakumar, D., Rubbenstroth, D., Martinez-Sobrido, L. & Munir, M. Avian interferons and their antiviral effectors. *Frontiers in Immunology* **8**, (2017).
 152. Piehler, J., Thomas, C., Christopher Garcia, K. & Schreiber, G. Structural and dynamic determinants of type I interferon receptor assembly and their functional interpretation. *Immunol. Rev.* **250**, (2012).
 153. O'Brien, M. A., Moravec, R. A. & Riss, L. Poly (ADP-ribose) polymerase cleavage monitored in situ in apoptotic cells. *BioTechniques* **30**, (2001).
 154. Manzoni, T. B. & López, C. B. Defective (interfering) viral genomes re-explored: Impact on antiviral immunity and virus persistence. *Future Virology* **13**, (2018).
 155. Genoyer, E. & López, C. B. The Impact of Defective Viruses on Infection and Immunity. *Annu. Rev. Virol.* **6**, (2019).
 156. Martín Hernández, A. M., Carrillo, E. C., Sevilla, N. & Domingo, E. Rapid cell variation can determine the establishment of a persistent viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, (1994).
 157. Kane, M. & Golovkina, T. Common Threads in Persistent Viral Infections. *J. Virol.* (2010). doi:10.1128/JVI.01905-09
 158. Fernando, F. S. *et al.* Assessment of molecular and genetic evolution, antigenicity and virulence properties during the persistence of the infectious bronchitis virus in broiler breeders. *J. Gen. Virol.* **98**, (2017).
 159. Bangham, C. R. M. & Kirkwood, T. B. L. Defective interfering particles and virus evolution. *Trends in Microbiology* **1**, (1993).
 160. Stetson, D. B. & Medzhitov, R. Type I Interferons in Host Defense. *Immunity* **25**, (2006).
 161. Kasanga, C. J. *et al.* Detection of infectious bursal disease virus (IBDV) genome in free-

living pigeon and guinea fowl in Africa suggests involvement of wild birds in the epidemiology of IBDV. *Virus Genes* (2008). doi:10.1007/s11262-008-0219-z

162. Karpala, A. J., Stewart, C., McKay, J., Lowenthal, J. W. & Bean, A. G. D. Characterization of Chicken Mda5 Activity: Regulation of IFN- β in the Absence of RIG-I Functionality. *J. Immunol.* **186**, (2011).
163. García-Arriaza, J., Ojosnegros, S., Dávila, M., Domingo, E. & Escarmís, C. Dynamics of Mutation and Recombination in a Replicating Population of Complementing, Defective Viral Genomes. *J. Mol. Biol.* **360**, (2006).
164. Treuhaft, M. W. & Beem, M. O. Defective interfering particles of respiratory syncytial virus. *Infect. Immun.* **37**, (1982).
165. Strahle, L., Garcin, D. & Kolakofsky, D. Sendai virus defective-interfering genomes and the activation of interferon-beta. *Virology* **351**, (2006).
166. Mercado-López, X. *et al.* Highly immunostimulatory RNA derived from a Sendai virus defective viral genome. *Vaccine* **31**, (2013).
167. Li, D. *et al.* Defective interfering viral particles in acute dengue infections. *PLoS One* **6**, (2011).
168. Salinas, Y. & Roux, L. Replication and packaging properties of short Paramyxovirus defective RNAs. *Virus Res.* **109**, (2005).
169. Fonville, J. M., Marshall, N., Tao, H., Steel, J. & Lowen, A. C. Influenza Virus Reassortment Is Enhanced by Semi-infectious Particles but Can Be Suppressed by Defective Interfering Particles. *PLoS Pathog.* **11**, (2015).

ANEXOS

Anexo 1. Material suplementario.

Figura 1. Secuencias de nucleótidos de IBDV WT e IBDV persistente (P).

1.1. IBDV WT Segmento A

GGATACGATCGGTCTGACCCGGGGGGAGTCACCCGGGGACAGGCTGACAAGGCCTTGTTCAGGATGGAA
CTCCTCCTTCTACAACGCTATCATTGATGGTTAGTAGAGATCAGACAAACGATCGCAGCGATGACAAACC
TGCAAGATCAAACCCAACAGATTGTTCCGTTTCATACGGAGCCTTCTGATGCCAACAACCCGACCGGCGTC
CATTCCGGACGACACCCCTGGAGAAGCACACTCTCAGGTCAGAGACCTCGACCTACAATTTGACTGTGGGG
GACACAGGGTCAGGGCTAATTGTCTTTTTCCCTGGATTCCCTGGCTCAATTGTGGGTGCTCACTACACAC
TGCAGGGCAATGGGAACTACAAGTTCGATCAGATGCTCCTGACTGCCCAGAACCTACCGGCCAGTTACAA
CTACTGCAGGCTAGTGAGTCGGAGTCTCACAGTGAGGTCAAGCACACTTCCCTGGTGGCGTTTATGCACTA
AACGGCACCATAAACGCCGTGACCTTCCAAGGAAGCCTGAGTGAACGACTGACAGATGTTAGCTACAATGGGT
TGATGTCTGCAACAGCCAACATCAACGACAAAATTGGGAACGTCCTAGTAGGGGAAGGGGTACCGTCTCT
CAGCTTACCCACATCATATGATCTTGGGTATGTGAGGCTTGGTGACCCCATTTCCCGCAATAGGGCTTGAC
CCAAAAATGGTAGCCACATGTGACAGCAGTGACAGGCCAGAGTCTACACCATAACTGCAGCCGATGATT
ACCAATTTCTCATCACAGTACCAACCAGGTGGGGTAACAATCACACTGTTCTCAGCCAACATTGATGCCAT
CACAAGCCTCAGCGTTGGGGGAGAGCTCGTGTTCGAACAAGCGTCCACGGCCTTGTACTGGGCGCCACC
ATCTACCTCATAGGCTTTGATGGGACAACGGTAATCACCAGGGCTGTGGCCGCAAACAATGGGCTGACGA
CCGGCACCAGAACCTTATGCCATTCAATCTTGTGATTCCAACAACGAGATAACCCAGCCAATCACATC
CATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGTCAGGCAGGGGATCAGATGTCATGGTCGGCAAGA
GGGAGCTTAGCAGTGACGATCCATGGTGGCAACTATCCAGGGGCCCTCCGTCCCGTCACGCTAGTGGCCT
ACGAAAGAGTGGCAACAGGATCCGTCTTACGGTTCGTTGGGGTGGCAACTTCGAGCTGATCCCAAATCC
TGAAGTAGCAAAGAACCTGGTTACAGAATACGGCCGATTTGACCCAGGAGCCATGAACTACACAAAATTG
ATACTGAGTGAGAGGGACCGTCTTGGCATCAAGACCGTCTGGCCAACAAGGGAGTACACTGACTTTTCGTG
AATACTTCATGGAGGTGGCCGACCTCAACTCTCCCTGAAGATTGCAGGAGCATTCCGGCTTCAAAGACAT
AATCCGGGCCATAAAGGAGGATAGCTGTGCCGGTGGTCTCCACATTGTTCCACCTGCCGCTCCCTTAGCC
CATGCAATTGGGGAAGGTGTAGACTACCTGCTGGGCGATGAGGACCAGGCCGCTTCAGGAAGTCTCGAG
CCGCGTCAGGAAAAGCAAGAGCTGCCCTCAGGCCGATAAAGCAGCTGACTCTCGCCGCCGACAAGGGGTA
CGAGGTAGTCGGAATCTATTCAGGTGCCCGAGAATCCCGTAGTCGACGGGATTCCTTGCTTACCTGGG
GTACTCCGCGGTGCACACAACCTCGACTGCGTGTAAAGAGAGGGTGCACGCTATTCCCTGTGGTTATTA
CGACAGTGGAAAGACGCCATGACACCCAAAGCATTGAACAGCAAATGTTTGCTGTATTGAAGGCGTGCG
AGAAGACCTCCAACCTCCATCTCAAAGAGGATCCTTCATACGAACCTCTCTTGACACAGAGTCTATGGA
TATGCTCCAGATGGGGTACTTCCACTGGAGACTGGGAGAGACTACACCGTTGTCCCAATAGATGATGTCT
GGGACGACAGCATTATGCTGTCCAAAGATCCCATACCTCCTATTGTGGGAAACAGTGGAAATCTAGCCAT
AGCTTACATGGATGTGTTTCGACCCAAAGTCCCAATCCATGTGGCTATGACGGGAGCCCTCAATGCTTGT
GGCGAGATTGAGAAAAGTAAGCTTTAGAAGCACAAGCTCGCTACTGCACACCGACTTGGCCTTAGGTTGG
CTGGTCCCGGAGCATTGATGTAAACACCGGGCCCAACTGGGCAACGTTTCATCAAACGTTTCCCTCACAA
TCCACGCGACTGGGACAGGCTCCCTTACCTCAACCTACCATACTTCCACCCAATGCAGGACGCCAGTAC
CACCTTGCCATGGCTGCATCAGAGTTCAAAGAGACCCCGAACTCGAGAGTGCCGTCAGAGCAATGGAAG
CAGCAGCCAACGTGGACCCACTATTCCAATCTGCACCTCAGTGTGTTTCATGTGGCTGGAAGAGAATGGGAT
TGTGACTGACATGGCCAACCTTCGCACTCAGCGACCCGAACGCCCATCGGATGCGAAATTTTCTTGCAAC
GCACCACAAGCAGGCAGCAAGTCGCAAAGGGCCAAGTACGGGACAGCAGGCTACGGAGTGGAGGCTCGGG
GCCCCACACCAGAGGAAGCACAGAGGGAAAAAGACACACGGATCTCAAAGAAGATGGAGACCATGGGCAT
CTACTTTGCAACACCAGAATGGGTAGCACTCAATGGGCACCGAGGGCCAAGCCCCGGCCAGCTAAAGTAC
TGGCAGAACACACGAGAAATACCGGACCCAAACGAGGACTATCTAGACTACGTGCATGCAGAGAAGAGCC
GGTTGGCATCAGAAGAACAAATCCTAAGGGCAGCTACGTCGATCTACGGGGCTCCAGGACAGGCAGAGCC
ACCCCAAGCTTTCATAGACGAAGTTGCCAAAGTCTATGAAATCAACCATGGACGTGGCCCAAACCAAGAA
CAGATGAAAGATCTGCTCTTACTGCGATGGAGATGAAGCATCGCAATCCCAGGCGGGCTCTACCAAAGC
CCAAGCCAAAACCCAATGCTCCAACACAGAGACCTCCTGGTTCGGCTGGGCGCGTGGATCAGGACCGTCTC
TGATGAGGACCTTGTGAGTGGGCTCCTGGGAGTCTCCCGACACCACCCGCGCAGGTGTGGACACCAATTGC
GCCTTACAACATCCCAAATGGATCCGTTCCGCGGTCCCT

1.2. IBDV WT Segmento B

GGATACGATGGGTCTGACCCCTCTGGGAGTCACGAATTAACGTGGCTACTAGGGGCGATACCCGCCGCTGG
CCGCCACGTTAGTGGCTCCTCTTCTTGATGATTCCTGCCACCATGAGTGACGTTTTCAATAGTCCACAGGC
GCGAAGCAGGATCTCAGCAGCGTTCCGGCATAAAGCCTACTGCTGGACAAGACGTGGAAGAACTCTTGATC
CCTAAAGTTTTGGGTGCCACCTGAGGATCCGCTTGCCAGCCCTAGTCGACTGGCAAAGTTCCTCAGAGAGA
ACGGCTACAAAGTTTTGCAGCCGCGGTCTCTGCCCGAGAATGAGGAGTATGAGACCGACCAAATACTCCC
AGACTTAGCATGGATGCGACAGATAGAAGGGGCTGTTTTAAAACCCACTCTATCTCTCCCTATTGGAGAT
CAGGAGTACTTCCCAAAGTACTACCCAACACATCGCCCTAGCAAGGAGAAGCCCAATGCGTACCCACCAG
ACATCGCACTACTCAAGCAGATGATTTACCTGTTTTCTCCAGGTTCCAGAGGCCAACGAGGGCCATAAGGA
TGAAGTAACCCTCTTGACCCAAAACATAAGGGACAAGGCCATATGGAAGTGGGACCTACATGGGACAAGCA
ACTCGACTTGTGGCCATGAAGGAGGTGCCACTGGAAGAAACCCAAACAAGGATCCTCTAAAGCTTGGGT
ACACTTTTGAGAGCATCGCGCAGCTACTTGACATCACACTACCGGTAGGCCACCCGGTGGAGGATGACAA
GCCCTGGGTGCCACTACAAGAGTGCCGTACGGATGTTGGTGCTGACGGGAGACGTAGATGGCGACTTT
GAGGTTGAAGATTACCTTCCAAAATCAACCTCAAGTCATCAAGTGGACTACCATATGTAGGTCGCACCA
AAGGAGAGACAATTGGCGAGATGATAGCTATATCAAACAGTTCCTCAGAGAGCTATCAACACTGTTGAA
GCAAGGTGCAGGGACAAAGGGTCAAACAAGAAGAAGCTACTCAGCATGTTAAGTGACTATTGGTACTTA
TCATGCGGGCTTTTTGTTTCCAAAGGCTGAAAGGTACGACAAAAGTACATGGCTCACCAGACCCGGAACA
TATGGTCAGTCCATCCCCAACACACCTCATGATCTCCATGATCACCTGGCCCGTGATGTCCAACAGCCC
AAATAACGTGTTGAACATTGAAGGGTGTCCATCACTCTACAAATTCACCCCGTTCAGAGGAGGGTTGAAC
AGGATCGTCGAGTGGATATTGGCCCCGGAAGAACCCAAAGGCTCTTGTATATGCGGACAACATATACATTG
TCCACTCAAACACGTGGTACTCAATTGACCTAGAGAAGGGTGGAGGAACTGCACTCGCCAACACATGCA
AGCCGCAATGTACTACATACTACCAGAGGGTGGTACGACAACGGCGACCCCAATGTTCAATCAAACATGG
GCCACCTTTGCCATGAACATTGCCCCGTCTTAGTGGTGGACTCATCGTGCCTGATAATGAACCTGCAAA
TTAAGACCTATGGTCAAGGCAGCGGGAATGCAGCCAGTTCATCAACAACCACCTCTTGAGCAGCTAGT
GCTTGACCAGTGGAACTTGATGAGACAGCCAGACCAGACAGCGAGGAGTTCAAATCAATTGAGGACAAG
CTAGGTATCAACTTTAAGATTGAGAGGTCCATTGATGATATCAGGGGCAAGCTGAGACAGCTTGTCTCTC
TTGCACAACCAGGGTACCTGAGTGGGGGGTGAACCAGAACAATCCAGCCCAACTGTTGAGCTTGACCT
ACTAGGGTGGTCAGCTACATAACAGCAAAGATCTCGGGATCTATGTGCCGGTGTGACAAGGAACGCCTA
TTTTGTCTGCTGCGTATCCCAAGGGAGTAGAGAACAAGAGTCTCAAGTCCAAAGTCGGGATCGAGCAGG
CATAAAGGTAGTCAGGTATGAGGCGTTGAGGTTGGTAGGTGGTTGGAACCTACCCTCCTGAACAAAGC
CTGCAAGAATAACGCAGGCGCCGCTCGGCGGCATCTGGAGGCCAAGGGGTTCCCACTCGACGAGTTCCCTA
GCCGAGTGGTCTGAGCTGTGAGAGTTCGGTGAGGCCCTCGAAGGCTTCAATATCAAGCTGACCGTAACAT
CTGAGAGCCTAGCCGAACTGAACAAGCCAGTACCCCCAAGCCCCAAATGTCAACAGACCAGTCAACAC
TGGGGGACTCAAGGCAGTCAGCAACGCCCTCAAGACCGGTGCGTACAGGAACGAAGCCGACTGAGTGGT
CTCGTCTCTTAGCCACAGCAAGAAGCCGTCTGCAAGATGCAGTTAAGGCCAAGGCAGAAGCCGAGAAAC
TCCACAAGTCCAAGCCAGACGACCCCGATGCAGACTGGTTCGAAAGATCAGAACTCTGTGACACCTTCT
GGAGAAAGCCGACATCGCCAGCAAGGTGCGCCACTCAGCACTCGTGGAACAAGCGACGCCCTTGAAGCA
GTTGAGTCACTTCCGTGTACACCCCAAGTACCCAGAAGTCAAGAACCACAGACCGCCTCCAACCCCG
TTGTTGGGCTCCACCTGCCCGCAAGAGAGCCACCGGTGTCCAGGCCGCTCTTCTCGGAGCAGGAACGAG
CAGACCAATGGGGATGGAGGCCCAACACGGTCCAAGAACGCCGTGAAAATGGCCAAACGGCGGCAACGC
CAAAAGGAGAGCCGCTAACAGCCATGATGGGAACCACTCAAGAAGAGGACACTAATCCCAGACCCCGTAT
CCCCGGCTTCGCTGCGGGGGCCCC

1.3. IBDV P Segmento A

GGATACGATCGGTCTGACCCCGAGGGAGTCACCCGGGGACAGGCCGTCAAGGCTTTGTTCCAGGATGGAA
CTCCTCCTTCTACAACGCTATCATTTGATGGTTAGTAGAGATCAGACAAACGATCGCAGCGATGACAAACC
TGACAGATCAAACCCAACAGATTGTTCCGTTTCATACGGAGCCTTCTGATGCCAACAACCCGACCCGGCGTC
CATTCCGGACGACACCCCTGGAGAAGCACACTCTCAGGTGAGAGACCTCGACCTACAATTTGACTGTGGGG
GACACAGGGTCAAGGCTAATTGTCTTTTTCCCTGGATTCCCTGGCTCAATTGTGGGTGCTCACTACACAC
TGCAGAGCAATGGGAACTACAAGTTCGATCAGATGCTCCTGACTGCCAGAACCTACCGGCCAGTTACAA
CTACTGCAGGCTAGTGAGTCCGAGTCTCACAGTGGGTCAAGCACACTCCCTGGTGGCGTTTTATGCACTA
AACGGCACCATAAACGCCGTGACCTTCCAAGGAAGCCTGAGTGAACCTGACAGATGTTAGCTACAATGGGT
TGATGTCTGCAACGGCCAACATCAACGACAAAATTTGGGAATGCTCCTGGTAGGGGAGGGGGTACCCGCTCT
CAGCTTACCCACATCATATGATCTTGGGTATGTGAGGCTTGGTGACCCATTCTGCTATAGGGCTTGAC

CCAAAAATGGTAGCCACATGTGACAGCAGTGACAGGCCAGAGTCTACACCATAACTGCAGCCGATGATT
ACCAATCTCATCACAGTACCAATCAGGTGGGGTAACAATCACACTGTTCTCAGCCAACATTGATGCTAT
CACAAGCCTCAGCATTGGGGGAGAGCTCGTGTTCATACAAGCGTCCATGGCCTTGCACTGGACGCCACC
ATCTACCTTATAGGCTTTGATGGGACTACAGTAATCACCAGAGCTGTGGCCTCAGACAATGGGCTGACTA
CCGGCATCGACAATCTTATGCCATTCAATCTTGTGATTCCAACCAACGAGATAACCCAGCCAATCACATC
CATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGCGGTGAGGCAGGGGACCAGATGTCATGGTCGGCAAGT
GGGAGCCTAGCAGTGACAATCCATGGTGGCAACTATCCAGGGGCCCTCCGTCCCCTCACACTAGTAGCCT
ACGAAAAGAGTGGCAACAGGATCCGTCGTTACGGTTCGCCGGGGTGGCAACTTCGAGCTGATCCCAAATCC
TGAAGTAGCAAAGAACCCTGGTTACAGAATACGGCCGATTTGACCCAGGAGCCATGAACTACACAAAATTG
ATACTGAGTGAGAGGGACCGTCTTGGCATCAAGACCGTCTGGCCAACAAGGGAGTACACTGACTTTTCGTG
AGTACTTCATGGAGGTGGCCGACCTCAACTCTCCCCTGAAGATTGCAGGAGCATTGGCTTCAAAGACAT
AATCCGGGCCATAAAGGAGGATAGCTGTGCCGGTGGTCTCTACATTTGTTCCCACCTGCAGCTCCCCTAGCC
CTTGCAATTGGGGAAGGTGTAGACTACCTGCTGGGCGATGAGGCACAGGCTGCTTCAGGAACTGCTCGAG
CCGCGTCAAGAAAAGCAAGAGCTGCCCTCAGGCCGTATAAGGCAGCTAACTCTCGCCGCTGACAAGGGGTA
CGAGGTTGTGCGGAATCTATTCCAGGTGCCCGAGAATCCCGTAGTCGACGGGATTCTTGCTTACCTGGG
GTACTCCGCGGCGCACACAACCTCGACTGCGTGTAAAGAGAGGGTGGCACGCTATTCCCTGTGGTCATTA
CGACAGTGGAAAGACGCCATGACACCCAAAGCACTGAACAGCAAAAATGTTTGCTGTATTGAAGGTGTGCG
AGAAGACCTCCAACCTCCATCTCAACGAGGATCCTTCATACGAACCCCTCCCGACACAGAGTCTATGGA
TATGCTCCAGATGGGGTACTTCCACTGGAGACTGGGAGAGACTACACCGTTGTCCCAATAGATGATGAT
GGGACGACAGCATTATGCTGTCCAAAGACCCCATACCTCCTATTGTGGGAAACAGTGGCAACCTAGCCAT
AGCTTACATGGATGTGTTTCGACCCAAAGTCCCCATCCATGTGGCCATGACAGGAGCCCTCAATGCTTGT
GGCGAGATTGAGAAAAGTAAGCTTTAGAAGCACAAGCTCGCCACTGCACACCGACTTGGCCTCAAGTTGG
CTGGTCCCGGAGCAATTCGATGTAAACACCGGGCCCAATTGGGCAACGTTTCATCAAACGTTTCCCTCACAA
TCCACGTGACTGGGACAGGCTCCCCTACCTCAACCTTCCATACCTTCCACCCAATGCAGGACGCCAGTAC
CACCTTGCCATGGCTGCATCAGAGTTCAAAGAGACCCCTGAACTCGAGAGCGCCGTGAGAGCCATGGAAG
CAGCAGCCAACGTGGACCCACTATTCCAATCTGCAATCAGTGTGTTTCATGTGGCTGGAAGAGAATGGGAT
TGTGACTGACATGGCCAACCTCGCACTCAGCGACCCGAACGCCCATCGGATGCGAAATTTTCTTGCAAAC
GCACCACAAGCAGGCAGCAAGTCGCAACGGGCCAAGTACGGGACAGCAGGCTACGGAGTGGAGGCCCGGG
GCCCCACACCAGAGGAAGCGCAGAGGGAAAAAGACACACGGATCTCAAAGAAGATGGAGACCATGGGCAT
CTACTTTGCAACACCAGAATGGGTAGCACTCAATGGGCACCGAGGGCCAAGCCCGGGCCAGCTAAAGTAC
TGGCAGAACACACGAGAAAATACCGGACCCAAACGAGGACTATCTAGACTACGTGCATGCAGAGAAGAGCC
GGTTGGCATCAGAAGAACAAAATCCAAAGGGCAGCTACGTGATCTACGGGGCTCCAGGACAGGCAGAGCC
ACCCAAAGCTTTCATAGACGAAGTTGCCAAAGTCTATGAAATCAACCATGGACGTGGCCCAAACCAAGAG
CAGATGAAAGATCTGCTCTTGACTGCGATGGAGATGAAGCATCGCAATCCCAGGCGGGCTCCACCAAAGC
CCAAGCCAAAACCAATGCTCCAACACCGAGACCCCTGGTCCGCTGGGCCGCTGGATCAGGACTGTCTC
TGATGAGGACCTTGAGTGAGGCTCCTGGGAGTCTCCCACACACCCGCGCAGGTGTGGACACCAATTCC
GTCTTACAACATCCCAAATGGATCCGTTCCGCGGTCCCCT

1.4. IBDV P Segment B

GGATACGATGGGTCTGACCCTCTGGGAGTCACGAATTAACATGGCTACTAGGGGCGATGCCCGCCTCTAA
CTGCCACGTTAGTGGCTCCTCTTCTTGATGATTCTGCCACCATGAGTGACATTTTCAACAGTCCACAGGC
GCGAAGCAAGATCTCAGCAGCGTTCCGCATAAAGCCTACTGCTGGACAAGACGTGGAAGAACTCTTGATC
CCTAAAGTCTGGGTGCCACCTGAGGATCCGCTTGCCAGCCCTAGTCGACTGGCAAAGTTCCTCAGAGAGA
ACGGCTACAAAGTTTTGCAGCCACGGTCTCTGCCCGAGAATGAGGAGTATGAGACCGACCAAATACTCCC
AGACTTAGCATGGATGCGACAGATAGAAGGGCTGTTTTAAAACCTACTCTATCTCTCCCATTGGAGAC
CAGGAGTACTTCCCAAAGTACTACCCAACACATCGCCCTAGCAAGGAGAAGACCAATGCGTACCCGCCAG
ACATCGCACTACTCAAGCAGATGATTTACCTGTTTTCTCCAGGTTCCAGAGGCCAACGAGGGCCATAAGGA
TGAAGTAACCTCCTGACCCAAAATATAAGGGATAAGGCCATGGAAGTGGGACCTACATGGGGCAAGCA
ACTCGACTTGTAGCCATGAAGGAGGTTGCCACTGGGAGAAACCCGAACAAGGATCCTCTAAAACCTGGGT
ACACTTTTGAGAGCATCGCGCAGCTGCTTGACATCACACTACCGGTAGGCCACCCGGTGGAGATGACAA
GCCCTGGGTGCCACTACAAGAGTGCCGTCGCGGATGTTGGTGTGACGGGAGACGTAGATGGCGACTTT
GAGGTTGAAGATTACCTTCCCAAATCAACCTCAAGTCATCAAGTGGACTACCATATGTAGGTCGCACCA
AAGGAGAGACAAATGGCGAGATGATAGCTATCTCAAACCAGTTTCTCAGAGAGCTATCAACACTGTTGAA
GCAAGGTGCAGGGACAAAGGGTCAAACAAGAAGAAGCTACTCAGCATGTTAAGTACTATTGGTACTTA
TCATGCGGGCTTTTTGTTTCCAAAGGCTGAAAGGTACGACAAAAGCACATGGCTCACCAAACCCGGAACA

TATGGTCAGCTCCATCCCCAACACACCTCATGATCTCCATGATCACCTGGCCCCGTGATGTCCAACAGCCC
 AAACAACGTGTTGAACATTGAAGGGTGTCCATCACTCTACAAATTC AACCCGTT CAGAGGAGGGTTGAAC
 AGGATCGTGCAGTGGATATTGGCTCCGGAAGAACCCAAGGCTCTTGTATATGCGGACAACATATACATTG
 TCCACTCAAACACGTGGTACTCAATTGACCTAGAGAAGGGCGAGGCAAACCTGCACACGCCAACACATGCA
 AGCCGCAATGTACTACATCCTCACCAGAGGGTGGTCAGACAACGGCGACCCAATGTTCAATCAAACATGG
 GCCACCTTTGCAATGAACATTGCCCTGCTCTAGTGGTAGACTCATCGTGCCTGATAATGAACCTGCAAA
 TTAAGACCTATGGTCAAGGCAGCGGGAATGCAGCCACGTTTCATCAATAACCACCTCTTGAGCAGCTAGT
 GCTTGACCAGTGGAACTGATGAGACAGCCCAGACCAGACAGCGAGGAGTTC AATCAATTGAGGACAAG
 CTAGGCATCAACTTCAAGATTGAGAGGTCCATTGATGACATCAGGGGCAAGCTGAGACAGCTTGTCCCC
 TTGCACAACCAGGGTACCTGAGTGGGGGGTGAACCAGAACAATCCAGCCCAACTGTTGAGCTTGACCT
 ACTAGGGTGGTCAGCTACATACAGCAAAGATCTCGGGATCTATGTGCCGGTGTGACAAGGAACGCCTA
 TTTTGTCTGCGGGTATCCCAAGGGAGTAGAGAACAAGAGTCTCAAGTCTAAAGTCGGGATCGAGCAGG
 CATAAAGGTAGTCAGGTATGAGGCGTTGAGGTTGGTAGGTGGTTGGA ACTACCCACTCCTGAACAAAGC
 CTGCAAGAATAACGCAGGCGCTGCTCGGCGGCATCTGGAGGCCAAGGGGTTCCCACTCGACGAGTTCCTA
 GCCGAGTGGTCCGAGCTGTCAGAGTTCGGTGAGGCCTTCGAAGGCTTCAATATCAAGCTGACCGTAACAT
 CTGAGAGCCTAGCCGA ACTGAACAAGCCAGTACCCCCAAGCCCCCAAATGTCAACAGACCAGTCAACAC
 TGGGGGACTCAAGGCAGT CAGCAACGCCCTTAAGACCGGTTCGGTACAGGAACGAAGCCGACTGAGTGGT
 CTCGTCTTCTAGCCACAGCAAGGAGCCGTCTGCAAGACGCAGTTAAGGCCAAGGCAGAAGCCGAGAAAC
 TCCACAAGTCCAAGCCAGACGACCCCGATGCAGACTGGTTTTGAAAGATCAGAAACTCTGT CAGACCTTCT
 GGAGAAAGCCGACATCGCCAGTAAGGTGCGCCACTCAGCACTCGTGGAACAAGCGACGCTCTTGAAGCA
 GTTCAGTCGACTTCCGTGTACACCCCAAGTACCCAGAAGTCAAGAACCACAGACCCGCTCCAACCCCG
 TTGTTGGGCTCCACCTGCCCGCAAGAGAGCCACCGGTGTCCAGGCCGCTCTTCTCGGAGCAGGAACGAG
 CCGACCAATGGGGATGGAGGCCCAACACGGTCCAAGAACGCCGTGAAAATGGCCAAACGGCGGCAACGC
 CAAAAAGAGAGCCGCAATAGCCATGATGGGAACCACTCAAGAAGAGGACACTAATCCCAGACCCCGTAT
 CCCC GGCTTCGCCTGCGGGGGCCCC

Figura 2. Comparación de las secuencias de genomas de IBDV

Las comparaciones se llevaron a cabo con la herramienta de alineamiento LALIGN (https://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html) usando los parámetros seleccionados por defecto.

2.1. Segmento A

	10	20	30	40	50	60
WT	GGAUACGAUCGGUCUGACCCGGGGGAGUCACCCGGGGACAGGCUGACAAGCCUUGUUC					
 :					
P	GGAUACGAUCGGUCUGACCCGAGGGAGUCACCCGGGGACAGGCUGACAAGCCUUGUUC					
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
WT	CAGGAUGGAACUCCUUCUACAACGCUAUCAUUGAUGGUUAGUAGAGAUCAAGCAAAAC					
					
P	CAGGAUGGAACUCCUUCUACAACGCUAUCAUUGAUGGUUAGUAGAGAUCAAGCAAAAC					
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150	160	170	180
WT	GAUCGCAGCGAUGACAACCCUGCAAGAUAACAACCAACAGAUUGUUCGUAUCAUCGGAG					
					
P	GAUCGCAGCGAUGACAACCCUGCAGAUACAACCAACAGAUUGUUCGUAUCAUCGGAG					
	130	140	150	160	170	180
	190	200	210	220	230	240
WT	CCUUCUGAUGCCAACAACCCGACCGGCGUCCAUUCCGGACGACACCCUGGAGAAGCACAC					
					
P	CCUUCUGAUGCCAACAACCCGACCGGCGUCCAUUCCGGACGACACCCUGGAGAAGCACAC					
	190	200	210	220	230	240
	250	260	270	280	290	300
WT	UCUCAGGUCAGAGACCUCGACCUACA AUUUGACUGUGGGGACACAGGGUCAGGGCUAAU					

WT AACAAACGAGAUACCCAGCCAAUCACAUCCAUAACAACUGGAGAUAGUGACCUCAAAAG
 P AACCAACGAGAUACCCAGCCAAUCACAUCCAUAACAACUGGAGAUAGUGACCUCAAAAG
 1030 1040 1050 1060 1070 1080

1090 1100 1110 1120 1130 1140
 WT UGGUGGUCAGGCAGGGGAUCAGAUUGUCAUGGUCGGCAAGAGGGAGCCUAGCAGUGACGAU
 P UGGCGGUCAGGCAGGGGACCAGAUUGUCAUGGUCGGCAAGUGGGAGCCUAGCAGUGACAAU
 1090 1100 1110 1120 1130 1140

1150 1160 1170 1180 1190 1200
 WT CCAUGGUGGCAACUAUCCAGGGGCCUCCGUCCGUCACGCUAGUGGCCUACGAAAGAGU
 P CCAUGGUGGCAACUAUCCAGGGGCCUCCGUCCGUCACACUAGUAGCCUACGAAAGAGU
 1150 1160 1170 1180 1190 1200

1210 1220 1230 1240 1250 1260
 WT GGCAACAGGAUCCGUCGUUACGGUCGCGGGGUGAGCAACUUCGAGCUGAUCCCAAUCC
 P GGCAACAGGAUCCGUCGUUACGGUCGCGGGGUGAGCAACUUCGAGCUGAUCCCAAUCC
 1210 1220 1230 1240 1250 1260

1270 1280 1290 1300 1310 1320
 WT UGAACUAGCAAAGAACCUGGUUACAGAAUACGGCCGAUUUGACCCAGGAGCCAUGAACUA
 P UGAACUAGCAAAGAACCUGGUUACAGAAUACGGCCGAUUUGACCCAGGAGCCAUGAACUA
 1270 1280 1290 1300 1310 1320

1330 1340 1350 1360 1370 1380
 WT CACAAAUUGAUACUGAGUGAGAGGGACCGUCUUGGCAUCAAGACCGUCUGGCCAACAAAG
 P CACAAAUUGAUACUGAGUGAGAGGGACCGUCUUGGCAUCAAGACCGUCUGGCCAACAAAG
 1330 1340 1350 1360 1370 1380

1390 1400 1410 1420 1430 1440
 WT GGAGUACACUGACUUUCGUGAAUACUUCUUGGAGGUGGCCACCUAACUCUCCCGUAA
 P GGAGUACACUGACUUUCGUGAGUACUUCUUGGAGGUGGCCACCUAACUCUCCCGUAA
 1390 1400 1410 1420 1430 1440

1450 1460 1470 1480 1490 1500
 WT GAUUGCAGGAGCAUUCGGCUUCAAGACAUAAUCCGGGCCAUAGGAGGAUAGCUGUGCC
 P GAUUGCAGGAGCAUUCGGCUUCAAGACAUAAUCCGGGCCAUAGGAGGAUAGCUGUGCC
 1450 1460 1470 1480 1490 1500

1510 1520 1530 1540 1550 1560
 WT GGUGGUCUCCACAUGUUCUCCACCUGCCGUCUCCUAGCCUAGCAAUUGGGGAAGGUGU
 P GGUGGUCUCCACAUGUUCUCCACCUGCAGCUCUCCUAGCCUAGCAAUUGGGGAAGGUGU
 1510 1520 1530 1540 1550 1560

1570 1580 1590 1600 1610 1620
 WT AGACUACCUGCGUGGGCGAUGAGGACCAGGCCGUUCAGGAACUGCUCGAGCCGCGUCAGG
 P AGACUACCUGCGUGGGCGAUGAGGCACAGGCUGCUUCAGGAACUGCUCGAGCCGCGUCAGG
 1570 1580 1590 1600 1610 1620

1630 1640 1650 1660 1670 1680
 WT AAAAGCAAGAGCUGCCUCAGGCCGUAUAAGGCAGCUGACUCUCGCCGCCGACAAGGGGUA
 P AAAAGCAAGAGCUGCCUCAGGCCGUAUAAGGCAGCUAACUCUCGCCGCCGACAAGGGGUA
 1630 1640 1650 1660 1670 1680

1690 1700 1710 1720 1730 1740
 WT CGAGGUAGUCGCGAAUCUAUUCAGGUGCCCCAGAAUCCCGUAGUCGACGGGAUUCUUGC
 P CGAGGUAGUCGCGAAUCUAUUCAGGUGCCCCAGAAUCCCGUAGUCGACGGGAUUCUUGC
 1690 1700 1710 1720 1730 1740

1750 1760 1770 1780 1790 1800
 WT UUCACCUGGGGUACUCCGCGGUGCACACAACCUCGACUGCGUGUUAAGAGAGGGUGCCAC
 P UUCACCUGGGGUACUCCGCGGCGCACACAACCUCGACUGCGUGUUAAGAGAGGGUGCCAC
 1750 1760 1770 1780 1790 1800

	1810	1820	1830	1840	1850	1860
WT	GCUAUUCCUGUGGUUUAUACGACAGUGGAAGACGCCAUGACACCCAAAGCAUUGAACAG					
P	GCUAUUCCUGUGGUCAUUACGACAGUGGAAGACGCCAUGACACCCAAAGCACUGAACAG					
	1810	1820	1830	1840	1850	1860
	1870	1880	1890	1900	1910	1920
WT	CAAAAUGUUUGCUGUCAUUGAAGGCGUGCGAGAAGACCUCCAACCUCCAUCUCAAGAGG					
P	CAAAAUGUUUGCUGUCAUUGAAGGUGUGCGAGAAGACCUCCAACCUCCAUCUCAACGAGG					
	1870	1880	1890	1900	1910	1920
	1930	1940	1950	1960	1970	1980
WT	AUCCUUCAUACGAACUCUCUCUGGACACAGAGUCUAUGGAUAUGCUCAGAUUGGGUACU					
P	AUCCUUCAUACGAACCCUCUCUGGACACAGAGUCUAUGGAUAUGCUCAGAUUGGGUACU					
	1930	1940	1950	1960	1970	1980
	1990	2000	2010	2020	2030	2040
WT	UCCACUGGAGACUGGGAGAGACUACACCGUUGUCCCAAUAGAUGAUGUCUGGGACGACAG					
P	UCCACUGGAGACUGGGAGAGACUACACCGUUGUCCCAAUAGAUGAUGAUGUUGGGACGACAG					
	1990	2000	2010	2020	2030	2040
	2050	2060	2070	2080	2090	2100
WT	CAUUAUGCUGUCCAAAGAUCCCAUACCUCCUAUUGUGGGAAACAGUGGAAAUAGCCAU					
P	CAUUAUGCUGUCCAAAGACCCCAUACCUCCUAUUGUGGGAAACAGUGGCAACCUAGCCAU					
	2050	2060	2070	2080	2090	2100
	2110	2120	2130	2140	2150	2160
WT	AGCUUACAUGGAUGUGUUUCGACCCAAAGUCCCAAUCCAUGUGGCUAUGACGGGAGCCCU					
P	AGCUUACAUGGAUGUGUUUCGACCCAAAGUCCCAAUCCAUGUGGCUAUGACAGGAGCCCU					
	2110	2120	2130	2140	2150	2160
	2170	2180	2190	2200	2210	2220
WT	CAAUGCUUGUGGGAGAUUGAGAAAGUAAGCUUAGAAGCACCAAGCUCGCUACUGCACA					
P	CAAUGCUUGUGGGAGAUUGAGAAAGUAAGCUUAGAAGCACCAAGCUCGCCACUGCACA					
	2170	2180	2190	2200	2210	2220
	2230	2240	2250	2260	2270	2280
WT	CCGACUUGGCCUUAGGUUGGCGUGGCCCGGAGCAUUCGAUGUAAACACCGGGCCCAACUG					
P	CCGACUUGGCCUUAGGUUGGCGUGGCCCGGAGCAUUCGAUGUAAACACCGGGCCCAUUG					
	2230	2240	2250	2260	2270	2280
	2290	2300	2310	2320	2330	2340
WT	GGCAACGUUCAUCAAACGUUCCUCACAAUCCACGCGACUGGGACAGGCUCCCUACCU					
P	GGCAACGUUCAUCAAACGUUCCUCACAAUCCACGUGACUGGGACAGGCUCCCUACCU					
	2290	2300	2310	2320	2330	2340
	2350	2360	2370	2380	2390	2400
WT	CAACCUACCAUACCUUCCACCCAAUGCAGGACGCCAGUACCACCUUGCCAUGGCUGCAUC					
P	CAACCUACCAUACCUUCCACCCAAUGCAGGACGCCAGUACCACCUUGCCAUGGCUGCAUC					
	2350	2360	2370	2380	2390	2400
	2410	2420	2430	2440	2450	2460
WT	AGAGUUCAAAGAGACCCCGAACUCGAGAGUGCCGUCAGAGCAAUGGAAGCAGCAGCCAA					
P	AGAGUUCAAAGAGACCCCGAACUCGAGAGCGCCGUCAGAGCAAUGGAAGCAGCAGCCAA					
	2410	2420	2430	2440	2450	2460
	2470	2480	2490	2500	2510	2520
WT	CGUGGACCACUAUUCCAUCUGCACUCAGUGUGUUAUGUGGCUGGAAGAGAAUGGGAU					
P	CGUGGACCACUAUUCCAUCUGCAAUCAGUGUGUUAUGUGGCUGGAAGAGAAUGGGAU					
	2470	2480	2490	2500	2510	2520
	2530	2540	2550	2560	2570	2580
WT	UGUGACUGACAUGGCAACUUCGCACUCAGCGACCCGAACGCCCAUCGGAUGCGAAAUUU					
P	UGUGACUGACAUGGCAACUUCGCACUCAGCGACCCGAACGCCCAUCGGAUGCGAAAUUU					
	2530	2540	2550	2560	2570	2580

```

                2590      2600      2610      2620      2630      2640
WT  UCUUGCAAACGCACCACAAGCAGGCAGCAAGUCGCAAAGGGCCAAGUACGGGACAGCAGG
P  UCUUGCAAACGCACCACAAGCAGGCAGCAAGUCGCAAAGGGCCAAGUACGGGACAGCAGG
                2590      2600      2610      2620      2630      2640

                2650      2660      2670      2680      2690      2700
WT  CUACGGAGUGGAGGCUCGGGGCCCCACACCAGAGGAAGCACAGAGGGAAAAAGACACACG
P  CUACGGAGUGGAGGCCCGGGCCCCACACCAGAGGAAGCGCAGAGGGAAAAAGACACACG
                2650      2660      2670      2680      2690      2700

                2710      2720      2730      2740      2750      2760
WT  GAUCUCAAGAAGAUGGAGACCAUGGGCAUCUACUUUGCAACACCAGAAUGGGUAGCACU
P  GAUCUCAAGAAGAUGGAGACCAUGGGCAUCUACUUUGCAACACCAGAAUGGGUAGCACU
                2710      2720      2730      2740      2750      2760

                2770      2780      2790      2800      2810      2820
WT  CAAUGGGCACCGAGGGCCAAGCCCCGGCCAGCUAAAGUACUGGCAGAACACACGAGAAAU
P  CAAUGGGCACCGAGGGCCAAGCCCCGGCCAGCUAAAGUACUGGCAGAACACACGAGAAAU
                2770      2780      2790      2800      2810      2820

                2830      2840      2850      2860      2870      2880
WT  ACCGGACCCAAACGAGGACUAUCUAGACUACGUGCAUGCAGAGAAGAGCCGGUUGGCAUC
P  ACCGGACCCAAACGAGGACUAUCUAGACUACGUGCAUGCAGAGAAGAGCCGGUUGGCAUC
                2830      2840      2850      2860      2870      2880

                2890      2900      2910      2920      2930      2940
WT  AGAAGAACAAAUCUAAAGGGCAGCUACGUCGAUCUACGGGGCUC CAGGACAGGCAGAGCC
P  AGAAGAACAAAUCUAAAGGGCAGCUACGUCGAUCUACGGGGCUC CAGGACAGGCAGAGCC
                2890      2900      2910      2920      2930      2940

                2950      2960      2970      2980      2990      3000
WT  ACCCCAAGCUUUCUAGACGAAGUUGCCAAAGUCUUAUGAAAUCAACCAUGGACGUGGCC
P  ACCCCAAGCUUUCUAGACGAAGUUGCCAAAGUCUUAUGAAAUCAACCAUGGACGUGGCC
                2950      2960      2970      2980      2990      3000

                3010      3020      3030      3040      3050      3060
WT  AAACCAAGAACAGAUGAAAGAUUCGUCUCUUGACUGCGAUGGAGAUAGAAGCAUCGCAAUCC
P  AAACCAAGAGCAGAUGAAAGAUUCGUCUCUUGACUGCGAUGGAGAUAGAAGCAUCGCAAUCC
                3010      3020      3030      3040      3050      3060

                3070      3080      3090      3100      3110      3120
WT  CAGGCGGGCUCUACCAAAGCCCAAGCCAAAACCCAAUGCUCUCCAAACACAGAGACCUCCUGG
P  CAGGCGGGCUCUACCAAAGCCCAAGCCAAAACCCAAUGCUCUCCAAACACAGAGACCUCCUGG
                3070      3080      3090      3100      3110      3120

                3130      3140      3150      3160      3170      3180
WT  UCGGCUGGGCCGUGGAUCAGGACCGUCUCUGAUGAGGACCUUGAGUGAGGCUCUUGGGA
P  UCGGCUGGGCCGUGGAUCAGGACCGUCUCUGAUGAGGACCUUGAGUGAGGCUCUUGGGA
                3130      3140      3150      3160      3170      3180

                3190      3200      3210      3220      3230      3240
WT  GUCUCCCACACCCCGCGCAGGUGUGGACACCAAUUCGGCCUUACAACAUC CCAAUU
P  GUCUCCCACACCCCGCGCAGGUGUGGACACCAAUUCGGCCUUACAACAUC CCAAUU
                3190      3200      3210      3220      3230      3240

                3250      3260
WT  GGAUCCGUUCGCGGGUCCCU
P  GGAUCCGUUCGCGGGUCCCU
                3250      3260

```

97.3% de identidad en 3,261 nt alineados.

2.2. Segmento B

```
      10      20      30      40      50      60
WT  GGAUACGAUGGGUCUGACCCUCUGGGAGUCACGAAUUAACUGGCUACUAGGGGCGAUAC
    : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P   GGAUACGAUGGGUCUGACCCUCUGGGAGUCACGAAUUAACUGGCUACUAGGGGCGAUGC
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90     100     110     120
WT  CCGCCGCGGGCCACGUUAGUGGCUCUCUUCUUGAUGAUUCUGCCACCAUGAGUGAC
    : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P   CCGCCUCUAACUGCCACGUUAGUGGCUCUCUUCUUGAUGAUUCUGCCACCAUGAGUGAC
      70      80      90     100     110     120

      130     140     150     160     170     180
WT  GUUUUCAAUAGUCCACAGGCGCGAAGCACGAUCUCAGCAGCGUUCGGCAUAAAGCCUACU
    : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P   AUUUUCAACAGUCCACAGGCGCGAAGCAAGAUCUCAGCAGCGUUCGGCAUAAAGCCUACU
      130     140     150     160     170     180

      190     200     210     220     230     240
WT  GCUGGACAAGACGUGGAAGAACUCUUGAUCCCUAAAGUUUGGGUGCCACCCUGAGGAUCCG
    : : : : ~ : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P   GCUGGACAAGACGUGGAAGAACUCUUGAUCCCUAAAGUCUGGGUGCCACCCUGAGGAUCCG
      190     200     210     220     230     240

      250     260     270     280     290     300
WT  CUUGCCAGCCCUAGUCGACUGGCAAAGUUCUCAGAGAGAACGGCUACAAAGUUUUGCAG
    : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~
P   CUUGCCAGCCCUAGUCGACUGGCAAAGUUCUCAGAGAGAACGGCUACAAAGUUUUGCAG
      250     260     270     280     290     300

      310     320     330     340     350     360
WT  CCGCGGUCUCUGCCCGAGAAUGAGGAGUAUGAGACCGACCAAUACUCCAGACUUAGCA
    : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~
P   CCACGGUCUCUGCCCGAGAAUGAGGAGUAUGAGACCGACCAAUACUCCAGACUUAGCA
      310     320     330     340     350     360

      370     380     390     400     410     420
WT  UGGAUGCGACAGAUAAGAAGGGGUGUUUAAAACCCACUCUAUCUCUCCCUAUUGGAGAU
    : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~
P   UGGAUGCGACAGAUAAGAAGGGGUGUUUAAAACCUACUCUAUCUCUCCCUAUUGGAGAC
      370     380     390     400     410     420

      430     440     450     460     470     480
WT  CAGGAGUACUCCCAAAGUACUACCCAACACAUACGCCCAGCAAGGAGAAGCCCAAUGCG
    : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~
P   CAGGAGUACUCCCAAAGUACUACCCAACACAUACGCCCAGCAAGGAGAAGCCCAAUGCG
      430     440     450     460     470     480

      490     500     510     520     530     540
WT  UACCCACCAGACAUCGCACUACUCAAGCAGAUAUUUACCUUUCUCCAGGUUCCAGAG
    : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~
P   UACCCGCCAGACAUCGCACUACUCAAGCAGAUAUUUACCUUUCUCCAGGUUCCAGAG
      490     500     510     520     530     540

      550     560     570     580     590     600
WT  GCCAACGAGGGCCUAAAAGGAUGAAGUAACCCUCUUGACCCAAAACAUAAAGGGACAAGGCC
    : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~
P   GCCAACGAGGGCCUAAAAGGAUGAAGUAACCCUCUGACCCAAAUAUAAAGGGUAAGGCC
      550     560     570     580     590     600

      610     620     630     640     650     660
WT  UAUGGAAGUGGGACCUACAUUGGGACAAGCAACUCGACUUGUGGCAUGAAGGAGGUCGCC
    : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~
P   UAUGGAAGUGGGACCUACAUUGGGACAAGCAACUCGACUUGUAGCCAUAGAAGGAGGUUGCC
      610     620     630     640     650     660

      670     680     690     700     710     720
WT  ACUGGAAGAAACCCAAACAAGGAUCCUCUAAAAGCUUGGUACACUUUUGAGAGCAUCGCG
    : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~ : : : : ~
P   ACUGGGAGAAACCCGAACAAGGAUCCUCUAAAACUUGGUACACUUUUGAGAGCAUCGCG
      670     680     690     700     710     720
```


	730	740	750	760	770	780
WT	CAGCUACUUGACAUCACACUACCGGUAGGCCACCCGGUGAGGAUGACAAGCCUGGGUG					
P	CAGCUGCUUGACAUCACACUACCGGUAGGCCACCCGGUGAGGAUGACAAGCCUGGGUG					
	730	740	750	760	770	780
	790	800	810	820	830	840
WT	CCACUCACAAGAGUGCCGUCACGGAUGUUGGUGCUGACGGGAGACGUAGAUGGCACUUU					
P	CCACUCACAAGAGUGCCGUCGCGGAUGUUGGUGCUGACGGGAGACGUAGAUGGCACUUU					
	790	800	810	820	830	840
	850	860	870	880	890	900
WT	GAGGUUGAAGAUUACCUUCCCAAAUACAACCUCAGUCAAGUGGACUACCAUAUGUA					
P	GAGGUUGAAGAUUACCUUCCCAAAUACAACCUCAGUCAAGUGGACUACCAUAUGUA					
	850	860	870	880	890	900
	910	920	930	940	950	960
WT	GGUCGCACCAAAGGAGAGACAAUUGGCGAGAUGAUGCUAUAUCAAAACCAGUUUCUGA					
P	GGUCGCACCAAAGGAGAGACAAUUGGCGAGAUGAUGCUAUCUCAAAACCAGUUUCUGA					
	910	920	930	940	950	960
	970	980	990	1000	1010	1020
WT	GAGCUAUAACACUGUUGAAGCAAGGUGCAGGGACAAAGGGGUCAAACAAGAAGAGCUA					
P	GAGCUAUAACACUGUUGAAGCAAGGUGCAGGGACAAAGGGGUCAAACAAGAAGAGCUA					
	970	980	990	1000	1010	1020
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
WT	CUCAGCAUGUUAAGUGACUAUUGGUACUUAUCAUGCGGGCUUUUGUUCCAAGGCUGAA					
P	CUCAGCAUGUUAAGUGACUAUUGGUACUUAUCAUGCGGGCUUUUGUUCCAAGGCUGAA					
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
WT	AGGUACGACAAAAGUACAUGGCUCACCAAGACCCGGAACAUAUGGUCAGCUCCAUCCCA					
P	AGGUACGACAAAAGUACAUGGCUCACCAAAACCCGGAACAUAUGGUCAGCUCCAUCCCA					
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
WT	ACACACCUCAUGAUCUCCAUGAUCACCCUGGCCCGUGAUGUCCAACAGCCCAAUAACGUG					
P	ACACACCUCAUGAUCUCCAUGAUCACCCUGGCCCGUGAUGUCCAACAGCCCAAUAACGUG					
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
WT	UUGAACAUUGAAGGGUGUCCAUCACUCUACAAAUAACCCGUUCAGAGGAGGGUUGAAC					
P	UUGAACAUUGAAGGGUGUCCAUCACUCUACAAAUAACCCGUUCAGAGGAGGGUUGAAC					
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
WT	AGGAUCGUCGAGUGGAUAUUGGCCCGGAAGAACCCAAGGCUCUUGUAUAUGCGGACAAC					
P	AGGAUCGUCGAGUGGAUAUUGGCCCGGAAGAACCCAAGGCUCUUGUAUAUGCGGACAAC					
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
	1330	1340	1350	1360	1370	1380
WT	AUAUAUUGUCCACUCAAAACACGUGGUACUCAAUUGACCUAGAGAAGGGGAGGCAAAC					
P	AUAUAUUGUCCACUCAAAACACGUGGUACUCAAUUGACCUAGAGAAGGGGAGGCAAAC					
	1330	1340	1350	1360	1370	1380
	1390	1400	1410	1420	1430	1440
WT	UGCACUCGCCAACACAUGCAAGCCGAAUGUACUACUACUACCAGAGGGUGGUCAGAC					
P	UGCACUCGCCAACACAUGCAAGCCGAAUGUACUACUACUACCAGAGGGUGGUCAGAC					
	1390	1400	1410	1420	1430	1440
	1450	1460	1470	1480	1490	1500
WT	AACGGCGACCCAAUGUCAAUCAAAACAUGGGCCACCUUUGCCAUGAACAUUGCCCGUCU					
P	AACGGCGACCCAAUGUCAAUCAAAACAUGGGCCACCUUUGCCAUGAACAUUGCCCGUCU					

	1450	1460	1470	1480	1490	1500
	1510	1520	1530	1540	1550	1560
WT	CUAGUGGUGGACUCAUCGUGCCUGAUAAUGAACCGCAAAUUAAGACCUAUGGUCAAGGC					
P	CUAGUGGUAGACUCAUCGUGCCUGAUAAUGAACCGCAAAUUAAGACCUAUGGUCAAGGC					
	1510	1520	1530	1540	1550	1560
	1570	1580	1590	1600	1610	1620
WT	AGCGGGAAUGCAGCCACGUUCAACAACCACCUCUUGAGCACGCUAGUGCUUGACCAG					
P	AGCGGGAAUGCAGCCACGUUCAACAACCACCUCUUGAGCACGCUAGUGCUUGACCAG					
	1570	1580	1590	1600	1610	1620
	1630	1640	1650	1660	1670	1680
WT	UGGAACUUGAUGAGACAGCCAGACCAGACAGCGAGGAGUUCAAUCAAUUGAGGACAAG					
P	UGGAACCUUGAUGAGACAGCCAGACCAGACAGCGAGGAGUUCAAUCAAUUGAGGACAAG					
	1630	1640	1650	1660	1670	1680
	1690	1700	1710	1720	1730	1740
WT	CUAGGUAUCAACUUUAAGAUUGAGAGGUCCAUGAUGAUACAGGGGCAAGCUGAGACAG					
P	CUAGGCAUCAACUUUAAGAUUGAGAGGUCCAUGAUGAUACAGGGGCAAGCUGAGACAG					
	1690	1700	1710	1720	1730	1740
	1750	1760	1770	1780	1790	1800
WT	CUUGUCCUUCUUGCACAACCAGGGUACCUGAGUGGGGGGUUGAACAGAAUCCAGC					
P	CUUGUCCCCUUGCACAACCAGGGUACCUGAGUGGGGGGUUGAACAGAAUCCAGC					
	1750	1760	1770	1780	1790	1800
	1810	1820	1830	1840	1850	1860
WT	CCAACUGUUGAGCUGACCUACUAGGGUGGUCAGCUACAUCAGCAAAGAUUCUGGGGAUC					
P	CCAACUGUUGAGCUGACCUACUAGGGUGGUCAGCUACAUCAGCAAAGAUUCUGGGGAUC					
	1810	1820	1830	1840	1850	1860
	1870	1880	1890	1900	1910	1920
WT	UAUGUGCCGGUGCUUGACAAGGAACGCCUUAUUUGUUCUGCGUAUCCCAAGGGAGUA					
P	UAUGUGCCGGUGCUUGACAAGGAACGCCUUAUUUGUUCUGCGUAUCCCAAGGGAGUA					
	1870	1880	1890	1900	1910	1920
	1930	1940	1950	1960	1970	1980
WT	GAGAACAAGAGUCUCAAGUCCAAAGUCGGGAUCGAGCAGGCAUACAAGGUAGUCAGGUAU					
P	GAGAACAAGAGUCUCAAGUCCAAAGUCGGGAUCGAGCAGGCAUACAAGGUAGUCAGGUAU					
	1930	1940	1950	1960	1970	1980
	1990	2000	2010	2020	2030	2040
WT	GAGGCGUUGAGGUUGGUAGGUGUUGGAACUACCCACUCCUGAACAAAGCCUGCAAGAAU					
P	GAGGCGUUGAGGUUGGUAGGUGUUGGAACUACCCACUCCUGAACAAAGCCUGCAAGAAU					
	1990	2000	2010	2020	2030	2040
	2050	2060	2070	2080	2090	2100
WT	AACGCAGCGCCGUCGCGGCAUCUGGAGGCCAAGGGGUUCCACUCGACGAGUCCUA					
P	AACGCAGCGCUCGCGGCAUCUGGAGGCCAAGGGGUUCCACUCGACGAGUCCUA					
	2050	2060	2070	2080	2090	2100
	2110	2120	2130	2140	2150	2160
WT	GCCGAGUGGUCUGAGCUGUCAGAGUUCGUGAGGCCUUCGAAGGCUUCAUAUCAAGCUG					
P	GCCGAGUGGUCGAGCUGUCAGAGUUCGUGAGGCCUUCGAAGGCUUCAUAUCAAGCUG					
	2110	2120	2130	2140	2150	2160
	2170	2180	2190	2200	2210	2220
WT	ACCGUAACAUCUGAGAGCCUAGCCGAACUGAACAGCCAGUACCCCCAAGCCCCAAAU					
P	ACCGUAACAUCUGAGAGCCUAGCCGAACUGAACAGCCAGUACCCCCAAGCCCCAAAU					
	2170	2180	2190	2200	2210	2220
	2230	2240	2250	2260	2270	2280
WT	GUCAACAGACCAGUCAACACUGGGGACUCAAGGCAGUCAGCAACGCCCUCAAGACCGGU					
	::					

```

P      GUCAACAGACCAGUCAACACUGGGGACUCAAGGCAGUCAGCAACGCCCUUAAGACCGGU
      2230      2240      2250      2260      2270      2280
      2290      2300      2310      2320      2330      2340
WT     CGGUACAGGAACGAAGCCGGACUGAGUGGUCUCGUCCUUCUAGCCACAGCAAGAAGCCGU
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
P      CGGUACAGGAACGAAGCCGGACUGAGUGGUCUCGUCCUUCUAGCCACAGCAAGGAGCCGU
      2290      2300      2310      2320      2330      2340
      2350      2360      2370      2380      2390      2400
WT     CUGCAAGAUGCAGUUAAGGCCAAGGCAGAAGCCGAGAAACUCCACAAGUCCAAGCCAGAC
      :::::::::: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
P      CUGCAAGACGCAGUUAAGGCCAAGGCAGAAGCCGAGAAACUCCACAAGUCCAAGCCAGAC
      2350      2360      2370      2380      2390      2400
      2410      2420      2430      2440      2450      2460
WT     GACCCCGAUGCAGACUGGUUCGAAAGAUCAGAAACUCUGUCAGACCUUCUGGAGAAAGCC
      :::::::::::::::::::::: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
P      GACCCCGAUGCAGACUGGUUUGAAAGAUCAGAAACUCUGUCAGACCUUCUGGAGAAAGCC
      2410      2420      2430      2440      2450      2460
      2470      2480      2490      2500      2510      2520
WT     GACAUCGCCAGCAAGGUCGCCACUCAGCACUCGUGGAAACAAGCGACGCCUUGAAGCA
      :::::::::::::: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
P      GACAUCGCCAGUUAAGGUCGCCACUCAGCACUCGUGGAAACAAGCGACGUCUUGAAGCA
      2470      2480      2490      2500      2510      2520
      2530      2540      2550      2560      2570      2580
WT     GUUCAGUCGACUUCGGUGUACACCCCAAGUACCCAGAAGUCAAGAACCACAGACCGCC
      :::::::::::::::::::::: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
P      GUUCAGUCGACUUCGGUGUACACCCCAAGUACCCAGAAGUCAAGAACCACAGACCGCC
      2530      2540      2550      2560      2570      2580
      2590      2600      2610      2620      2630      2640
WT     UCCAACCCCGUUGUUGGGUCUCCACCUGCCCGCAAGAGAGCCACCGGUGUCCAGGCCGCU
      :::::::::::::::::::::: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
P      UCCAACCCCGUUGUUGGGUCUCCACCUGCCCGCAAGAGAGCCACCGGUGUCCAGGCCGCU
      2590      2600      2610      2620      2630      2640
      2650      2660      2670      2680      2690      2700
WT     CUUCUCGGAGCAGGAACGAGCAGACCAAUGGGGAUGGAGGCCCAACACGGUCCAAGAAC
      :::::::::::::::::::::: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
P      CUUCUCGGAGCAGGAACGAGCCGACCAAUGGGGAUGGAGGCCCAACACGGUCCAAGAAC
      2650      2660      2670      2680      2690      2700
      2710      2720      2730      2740      2750      2760
WT     GCCGUGAAAAUGGCCAAACGGCGGCAACGCCAAAAGGAGAGCCGCUAACAGCCAUGAUGG
      :::::::::::::::::::::: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
P      GCCGUGAAAAUGGCCAAACGGCGGCAACGCCAAAAGGAGAGCCGCUAACAGCCAUGAUGG
      2710      2720      2730      2740      2750      2760
      2770      2780      2790      2800      2810      2820
WT     GAACCACUCAAGAAGAGGACACUAAUCCAGACCCCGUAUCCCGGCCUUCGCCUGCGGG
      :::::::::::::::::::::: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
P      GAACCACUCAAGAAGAGGACACUAAUCCAGACCCCGUAUCCCGGCCUUCGCCUGCGGG
      2770      2780      2790      2800      2810      2820

WT     GGCCCC
      ::::::
P      GGCCCC

```

98.0% de identidad en 2,827 nt alineados

Figura 3. Comparación de secuencias proteicas de IBDV WT e IBDV P.

Las comparaciones se llevaron a cabo utilizando la herramienta de alineamiento SIM (<https://web.expasy.org/sim/>) utilizando los parámetros indicados por defecto.

3.1. Proteína no-estructural; VP5

WT	MVSRDQTNDRSDDKPARSNPTDCSVHTEPSDANNRTGVHSGRHPGEAHSQVRDLDLQFDC	60
P	MVSRDQTNDRSDDKPDNRNPTDCSVHTEPSDANNRTGVHSGRHPGEAHSQVRDLDLQFDC	60

WT	GGHRVRANCLFPWIPWLNCGCSLHTAGQWELQVRSDAPDCPEPTGQLQLLQASESESHSE	120
P	GGHRVRANCLFPWIPWLNCGCSLHTAEQWELQVRSDAPDCPEPTGQLQLLQASESESHSE	120

WT	VKHTSWWRLCTKRHHKRRDLPRKPE	145
P	VKHTPWRLCTKRHHKRRDLPRKPE	145

97.9% de identidad en 145 residuos alineados

3.2. Poliproteína

WT	MTNLQDQTQQIVPFIRSLMPTTGPASIPDDTLEKHTLRSETSTYNLTVGDTGSGGLIVFF	60
P	MTNLTDQTQQIVPFIRSLMPTTGPASIPDDTLEKHTLRSETSTYNLTVGDTGSGGLIVFF	60

WT	PGFPGSIVGAHYTLQNGNYKFDQMLLTAQNLPASYNCRSLVSRSLTVRSSTLPGGVYAL	120
P	PGFPGSIVGAHYTLQSNNGNYKFDQMLLTAQNLPASYNCRSLVSRSLTVRSSTLPGGVYAL	120

WT	NGTINAVTFQGSLSSELTVDVSYNGLMSATANINDKIGNVLVGEVTVLSLPTSVDLGYVRL	180
P	NGTINAVTFQGSLSSELTVDVSYNGLMSATANINDKIGNVLVGEVTVLSLPTSVDLGYVRL	180

WT	GDPIPAIGLDPKVMVATCDSSDRPRVYTTITAADDYQFSSQYQGGVTTITLFSANIDAITSL	240
P	GDPIPAIGLDPKVMVATCDSSDRPRVYTTITAADDYQFSSQYQSGVTTITLFSANIDAITSL	240

WT	SVGGELVFRTSVHGLVLGATIYILIGFDGTTVI TRAVAANGLTTGTDNLMFPNLVPTNE	300
P	SIGGELVFHTSVHGLALDATIYILIGFDGTTVI TRAVASDNGLTTGTDNLMFPNLVPTNE	300
	*.*****.*****.*.*****.*****.*****.*****	
WT	ITQPITSIKLEIVTSKSGGQAGDQMSWSARGSLAVTIHGGNYPGALRPVTLVAYERVATG	360
P	ITQPITSIKLEIVTSKSGGQAGDQMSWSASGSLAVTIHGGNYPGALRPVTLVAYERVATG	360

WT	SVVTVAGVSNFELIPNELAKNLVTEYGRFDPGAMNYTKLILSERDRGLIKTVWPTREY	420
P	SVVTVAGVSNFELIPNELAKNLVTEYGRFDPGAMNYTKLILSERDRGLIKTVWPTREY	420

WT	DFREYFMEVADLNSPLKIAGAFGFKDIRAIRRIAVPVVSTLFPFAAPLALAHGEGVDYL	480
P	DFREYFMEVADLNSPLKIAGAFGFKDIRAIRRIAVPVVSTLFPFAAPLALAHGEGVDYL	480

WT	LGDEDQAASGTARAASGKARAASGRIRQLTLAADKGYEVVANLFPVQNPVVDGILASPG	540
P	LGDEAQAASGTARAASGKARAASGRIRQLTLAADKGYEVVANLFPVQNPVVDGILASPG	540

WT	VLRGAHNLDVLRREGATLFPVVIITVEDAMTPKALNSKMFVIEGVREDLQPPSQRGSFI	600
P	VLRGAHNLDVLRREGATLFPVVIITVEDAMTPKALNSKMFVIEGVREDLQPPSQRGSFI	600

WT	RTLSGHRVYGYAPDGVLPLETGRDYTVVPIIDVWDDSIMLSKDFIPPIVGNLAIAYM	660
P	RTLSGHRVYGYAPDGVLPLETGRDYTVVPIIDVWDDSIMLSKDFIPPIVGNLAIAYM	660

WT	DVFRPKVPIHVAMTGALNACGIEKVSFRSTKLATAHRLGLRLAGPGAFDVNTGPNWATF	720
P	DVFRPKVPIHVAMTGALNACGIEKVSFRSTKLATAHRLGLKLAGPGAFDVNTGPNWATF	720

WT	IKRFPHNPRDWRDRLPYLNLPLYLPPNAGRQYHLAMAASEFKETPELESAVRAMEAAAANVDP	780
P	IKRFPHNPRDWRDRLPYLNLPLYLPPNAGRQYHLAMAASEFKETPELESAVRAMEAAAANVDP *****	780
WT	LFQSALSVMFMWLEENGIIVTDMANFALSDPNAHRMRNFLANAPQAGSKSQRAKYGTAGYGV	840
P	LFQSALSVMFMWLEENGIIVTDMANFALSDPNAHRMRNFLANAPQAGSKSQRAKYGTAGYGV *****	840
WT	EARGPTPEEAQREKDRISKKMETMGIYFATPEWVALNGHRGSPGQLKYWQNTREIPDP	900
P	EARGPTPEEAQREKDRISKKMETMGIYFATPEWVALNGHRGSPGQLKYWQNTREIPDP *****	900
WT	NEDYLDYVHAEKSRLASEEQILRAATS IYGAPGQAEPPQAFIDEVAKVYEINHGRGPNQE	960
P	NEDYLDYVHAEKSRLASEEQILRAATS IYGAPGQAEPPQAFIDEVAKVYEINHGRGPNQE *****	960
WT	QMKDLLLTAMEMKHRNPRRALPKPKPNAPTQRPPLGRWIRTVSDEdle	1012
P	QMKDLLLTAMEMKHRNPRRALPKPKPNAPTQRPPLGRWIRTVSDEdle *****	1012

98.2% de identidad en 1,012 residuos alineados

3.3. Polimerasa RNA dependiente de RNA, VP1

WT	MSDVFNSPQARSTISAAFGIKPTAGQDVEELLIIPKVWVPPEDPLASPSRLAKFLRENGYK	60
P	MSDVFNSPQARSKISAAFGIKPTAGQDVEELLIIPKVWVPPEDPLASPSRLAKFLRENGYK ***:*****	60
WT	VLQPRSLPENEEYETDQILPDLAWMRQIEGAVLKPTLSLPIGDQYFPHYPTHRPSKEK	120
P	VLQPRSLPENEEYETDQILPDLAWMRQIEGAVLKPTLSLPIGDQYFPHYPTHRPSKEK *****	120
WT	PNAYPPDIALLKQMIYLFQVPEANGLKDEVTLTQNIIRDKAYGSGTYMGQATRLVAMK	180
P	PNAYPPDIALLKQMIYLFQVPEANGLKDEVTLTQNIIRDKAYGSGTYMGQATRLVAMK *****	180
WT	EVATGRNPNKDKPLKGYTFESIAQLLDITLPVGPPEGDDKPVVPLTRVPSRMLVLTGDVD	240
P	EVATGRNPNKDKPLKGYTFESIAQLLDITLPVGPPEGDDKPVVPLTRVPSRMLVLTGDVD *****	240
WT	GDFEVEDYLPKINLKSSSGLPYVGRTKGETIGEMIAISNQFLRELSTLLKQAGTKGSNK	300
P	GDFEVEDYLPKINLKSSSGLPYVGRTKGETIGEMIAISNQFLRELSTLLKQAGTKGSNK *****	300
WT	KKLLSMLSDYWYLSGGLFPKAERYDKSTWLTTRNIWSAPSPHLMISMITWPVMSNSP	360
P	KKLLSMLSDYWYLSGGLFPKAERYDKSTWLTTRNIWSAPSPHLMISMITWPVMSNSP *****	360
WT	NNVLNIEGCPSLYKFNPRGGLNRIVEWILAPEEPKALVYADNIYIVHSNTWYSIDLEKG	420
P	NNVLNIEGCPSLYKFNPRGGLNRIVEWILAPEEPKALVYADNIYIVHSNTWYSIDLEKG *****	420
WT	EANCTRQHMQAAMYIILTRGWS DNGDPMFNQWATFAMNIAPALVVDSSCLIMNLQIKTY	480
P	EANCTRQHMQAAMYIILTRGWS DNGDPMFNQWATFAMNIAPALVVDSSCLIMNLQIKTY *****	480
WT	GQGSNAATFINNHLLSTLVLDQWNLMRQPRPDSEEFKSIEDKLGINFKIERSIDDIRGK	540
P	GQGSNAATFINNHLLSTLVLDQWNLMRQPRPDSEEFKSIEDKLGINFKIERSIDDIRGK *****	540
WT	LRQLVLLAQPGYLSGGVEPEQSSPTVELDLLGWSATYSKDLGIYVPVLDKERLFCSAAYP	600
P	LRQLVPLAQPGYLSGGVEPEQSSPTVELDLLGWSATYSKDLGIYVPVLDKERLFCSAAYP *****	600
WT	KGVENKSLKSKVGIEQAYKVVRYEALRLVGGWNYPLLKACKNNAGAARRHLEAKGFPLD	660
P	KGVENKSLKSKVGIEQAYKVVRYEALRLVGGWNYPLLKACKNNAGAARRHLEAKGFPLD *****	660
WT	EFLAEWSELSEFGAEFGFNKLTVTSES LAELNKVPPKPPNVNRPVNTGGLKAVSNAL	720
P	EFLAEWSELSEFGAEFGFNKLTVTSES LAELNKVPPKPPNVNRPVNTGGLKAVSNAL *****	720
WT	KTGRYRNEAGLSGLVLLATARSRLQDAVKAKAEKHLHKSPPDADWFERSETLSDLL	780

P	KTGRYRNEAGLSGLVLLATARSRLQDAVKAKAEAEKLNKSKPDDPDADWFERSETLSDLL *****	780
WT	EKADIASKVAHSALVETSDALEAVQSTSVYTPKYPEVKNPQTASNPVVGHLHPAKRATGV	840
P	EKADIASKVAHSALVETSDALEAVQSTSVYTPKYPEVKNPQTASNPVVGHLHPAKRATGV *****	840
WT	QAALLGAGTSRPMGMEAPTRSKNAVMAKRRQRQKESR- 878	
P	QAALLGAGTSRPMGMEAPTRSKNAVMAKRRQRQKESRQ 879 *****	

99.5% de identidad en 878 residuos alineados

ANEXO 2. Artículos publicados.



Type I Interferon Acts as a Major Barrier to the Establishment of Persistent Infectious Bursal Disease Virus Infections

Laura Broto,^a Nicolás Romero,^{a*} Fernando Méndez,^a Elisabet Diaz-Beneitez,^a Oscar Candelas-Rivera,^a Daniel Fuentes,^a Liliana L. Cubas-Gaona,^{a*} Céline Courtillon,^b Nicolas Eterradosi,^b Sébastien M. Soubies,^b Juan R. Rodríguez,^a Dolores Rodríguez,^a José F. Rodríguez^a

^aDepartamento de Biología Molecular y Celular, Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Madrid, Spain

^bOIE Reference Laboratory for Gumboro Disease, Avian and Rabbit Virology, Immunology and Parasitology Unit (VIPAC), French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety (ANSES), Ploufragan, France

Laura Broto, Nicolás Romero, and Fernando Méndez contributed equally to this work. Author order was determined by consensus among them.

ABSTRACT Infectious bursal disease virus (IBDV), the best-characterized member of the *Birnaviridae* family, is a highly relevant avian pathogen causing both acute and persistent infections in different avian hosts. Here, we describe the establishment of clonal, long-term, productive persistent IBDV infections in DF-1 chicken embryonic fibroblasts. Although virus yields in persistently infected cells are exceedingly lower than those detected in acutely infected cells, the replication fitness of viruses isolated from persistently infected cells is higher than that of the parental virus. Persistently infected DF-1 and IBDV-cured cell lines derived from them do not respond to type I interferon (IFN). High-throughput genome sequencing revealed that this defect is due to mutations affecting the IFN- α/β receptor subunit 2 (IFNAR2) gene, resulting in the expression of IFNAR2 polypeptides harboring large C-terminal deletions that abolish the signaling capacity of IFN- α/β receptor complex. Ectopic expression of a recombinant chicken IFNAR2 gene efficiently rescues IFN- α responsiveness. IBDV-cured cell lines derived from persistently infected cells exhibit a drastically enhanced susceptibility to establishing new persistent IBDV infections. Additionally, experiments carried out with human HeLa cells lacking the IFNAR2 gene fully recapitulate results obtained with DF-1 cells, exhibiting a highly enhanced capacity to both survive the acute IBDV infection phase and to support the establishment of persistent IBDV infections. Results presented here show that the inactivation of the JAK-STAT signaling pathway significantly reduces the apoptotic response induced by the infection, facilitating the establishment and maintenance of IBDV persistent infections.

IMPORTANCE Members of the *Birnaviridae* family, including infectious bursal disease virus (IBDV), exhibit a dual behavior, causing acute infections that are often followed by the establishment of lifelong persistent asymptomatic infections. Indeed, persistently infected specimens might act as efficient virus reservoirs, potentially contributing to virus dissemination. Despite the key importance of this biological trait, information about mechanisms triggering IBDV persistency is negligible. Our report evidences the capacity of IBDV, a highly relevant avian pathogen, to establish long-term, productive, persistent infections in both avian and human cell lines. Data presented here provide novel and direct evidence about the crucial role of type I IFNs on the fate of IBDV-infected cells and their contribution to controlling the establishment of IBDV persistent infections. The use of cell lines unable to respond to type I IFNs opens a promising venue to unveiling additional factors contributing to IBDV persistency.

KEYWORDS IFNAR2, apoptosis, birnavirus, double-stranded RNA virus, infectious bursal disease virus, interferons, persistent infection

Citation Broto L, Romero N, Méndez F, Diaz-Beneitez E, Candelas-Rivera O, Fuentes D, Cubas-Gaona LL, Courtillon C, Eterradosi N, Soubies SM, Rodríguez JR, Rodríguez D, Rodríguez JF. 2021. Type I interferon acts as a major barrier to the establishment of persistent infectious bursal disease virus infections. *J Virol* 95:e02017-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.02017-20>.

Editor Susana López, Instituto de Biotecnología/UNAM

Copyright © 2021 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to José F. Rodríguez, jfrodri@cnb.csic.es.

* Present address: Nicolás Romero, Department of Virology, Parasitology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Ghent, Belgium; Liliana L. Cubas-Gaona, OIE Reference Laboratory for Gumboro Disease, Avian and Rabbit Virology, Immunology and Parasitology Unit (VIPAC), French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety (ANSES), Ploufragan, France.

Received 13 October 2020

Accepted 4 December 2020

Accepted manuscript posted online 16 December 2020

Published 10 February 2021

Viruses are obligate intracellular pathogens establishing complex relationships with their hosts to successfully accomplish their main biological roles, i.e., replicating and spreading. Most viruses cause short-lived acute infections ensuring the production of an abundant infective progeny. This enables virus dissemination before the host's immune system clears the infection. As a general rule, viruses exploiting this strategy are cytotoxic. However, under certain circumstances, some lytic viruses, e.g., reoviruses and picornaviruses, deviate from this behavior and establish productive persistent infections in their hosts and/or in cultured cells (1, 2).

Members of the *Birnaviridae* family (3) also exhibit a dual behavior, causing acute infections that are often followed by the establishment of lifelong persistency. Epitomizing the major biological significance of this trait, birnaviruses belonging to all four family genera have been isolated from asymptomatic carrier specimens, including insects (4), fish (5, 6), and birds (reviewed in reference 7). In addition, several reports have described the detection of RNA and infectious bursal disease virus (IBDV) in tissues collected from experimentally infected chickens long after the vanishing of clinical signs of disease (8–10). Despite this, the characterization of the molecular basis underlying the initiation and maintenance of birnaviral persistent infections has been customarily overlooked. Hence, current information about this key biological feature, largely shaping birnavirus lifestyles, is rather scarce.

IBDV, the sole member of the *Avibirnavirus* genus, is the best-characterized component of the *Birnaviridae* family. IBDV virions are naked icosahedrons (65 to 70 nm in diameter; T=13L symmetry) harboring a single capsid enclosing a bipartite double-stranded RNA genome that encodes five mature polypeptides (VP1 to VP5) (7).

Although productively infecting a wide variety of bird species, clinical signs of disease have only been reported in juvenile (2 to 6 weeks old) domestic chickens (*Gallus gallus*). Two IBDV serotypes have been identified thus far. Serotype II strains, mainly isolated from asymptomatic turkeys (*Meleagris gallopavo*), are nonpathogenic for chickens. In contrast, all serotype I strains induce clinical signs of disease. However, the virulence of these strains is highly variable, ranging from mild to very virulent, with the latter causing very high (nearing 100%) mortality rates in unvaccinated chicken flocks. Indeed, very virulent IBDV strains pose a major threat to the poultry industry worldwide (reviewed in reference 11).

Several years ago, our group described the establishment of IBDV persistent infections in chicken DT40 cultured cells (12). Regrettably, DT40 cells originated from a chicken lymphoma, hence, *ab initio* being persistently infected with avian leukosis virus (ALV) (13). Indeed, the presence of coinfecting ALV posed a major obstacle to studying the mechanism(s) allowing the establishment of IBDV persistent infections.

Here, we describe an experimental model allowing us to generate long-term, stable, persistent IBDV infections in chicken DF-1 and human HeLa cells, both free of endogenous viruses.

Our results show that IBDV infection involves an acute phase characterized by very active virus replication, the release of high virus titers, and a massive apoptotic response that kills most infected cells. Cells surviving the initial acute phase remain persistently infected, sustaining cell proliferation while enduring highly mitigated virus replication. The long-term maintenance of persistently infected DF-1 cells leads to the selection of clonal cell populations unable to respond to type I interferon (IFN).

Data collected after the pharmacological elimination of IBDV from persistently infected cells indicate that the functional inactivation of type I IFN signaling drastically increases both the capacity of infected cells to survive the acute IBDV infection phase and their susceptibility to establishing new persistent infections. Work carried out with a knockout human HeLa cell line unable to respond to type I IFN fully recapitulates data gathered with chicken DF-1 cells.

This report provides a novel molecular insight about the crucial role of type I IFNs in the fate of IBDV-infected cells and their contribution to controlling the establishment of IBDV persistent infections.

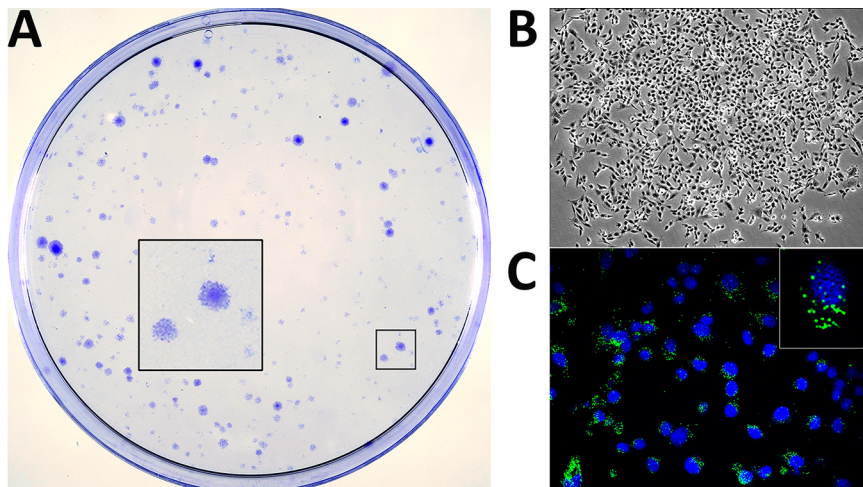


FIG 1 Generation of persistently infected DF-1 cell cultures. DF-1 cell monolayers were infected with IBDV at an MOI of 3 PFU/cell. At 4 days p.i., cultures were carefully rinsed to remove cell debris and then maintained in DMEM supplemented with 10% FCS. Culture medium was replaced every 5 days. At 21 days p.i., cultures were either stained with crystal violet to visualize surviving cell clones (A) or processed for phase-contrast (B) or IF (C) microscopy after incubation with an antibody specifically recognizing the IBDV structural VP3 polypeptide (green). Cell nuclei (blue) were stained with DAPI. Insets show a higher magnification ($\times 2.5$) of boxed areas.

RESULTS

Establishment of IBDV persistent infections. Infection of DF-1 cell monolayers with IBDV invariably leads to massive cell death within the first 48 to 72 h postinfection (p.i.). However, a marginal fraction of infected cells remains alive long after this period. This recurrent observation led us to perform a detailed characterization of this phenomenon.

Preconfluent DF-1 monolayers were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 3 PFU per cell with IBDV. Four days later, culture plates were rinsed twice with DMEM to remove cell debris and then maintained in normal medium. Cell culture medium was routinely replaced every 5 days. After 3 weeks, cultures were either stained with crystal violet to visualize surviving cells or processed for immunofluorescence (IF) to assess the expression of the virus-encoded VP3 polypeptide.

As shown in Fig. 1A, after the 21-day recovery period, culture plates were populated with well-differentiated cell islets exhibiting a wide size range. Microscopic analysis indicated that, regardless of their size, islets were formed by healthy-looking cells (Fig. 1B) showing a specific VP3 IF signal formed by discrete protein accumulations within the perinuclear region (Fig. 1C). Indeed, VP3 expression indicated that cell islets were formed by persistently infected cells. These cultures are termed persistently infected DF-1 (DF-1P).

Assuming the clonal origin of these cell islets and considering the number of them versus the initial number of infected cells in the plates, data gathered from three independent experiments indicate that $0.023\% \pm 0.007\%$ of the infected DF-1 cell population survives the acute IBDV infection phase.

It is worth noting that during the first two to three months, DF-1P cultures undergo sporadic crises resulting in the death of a substantial fraction of the total cell population. However, after this period, cultures become stable, maintaining steady proliferation rates.

Characterization of DF-1P cultures. Three independently generated DF-1P cultures were maintained for a period of 180 days and then used to assess three critical parameters, i.e., expression of virus-encoded proteins, accumulation of viral RNAs, and extracellular infectious virus production. Mock- and acutely infected (3 PFU/cell) naive DF-1 cells collected at 18 h p.i. were used as controls for these assays.

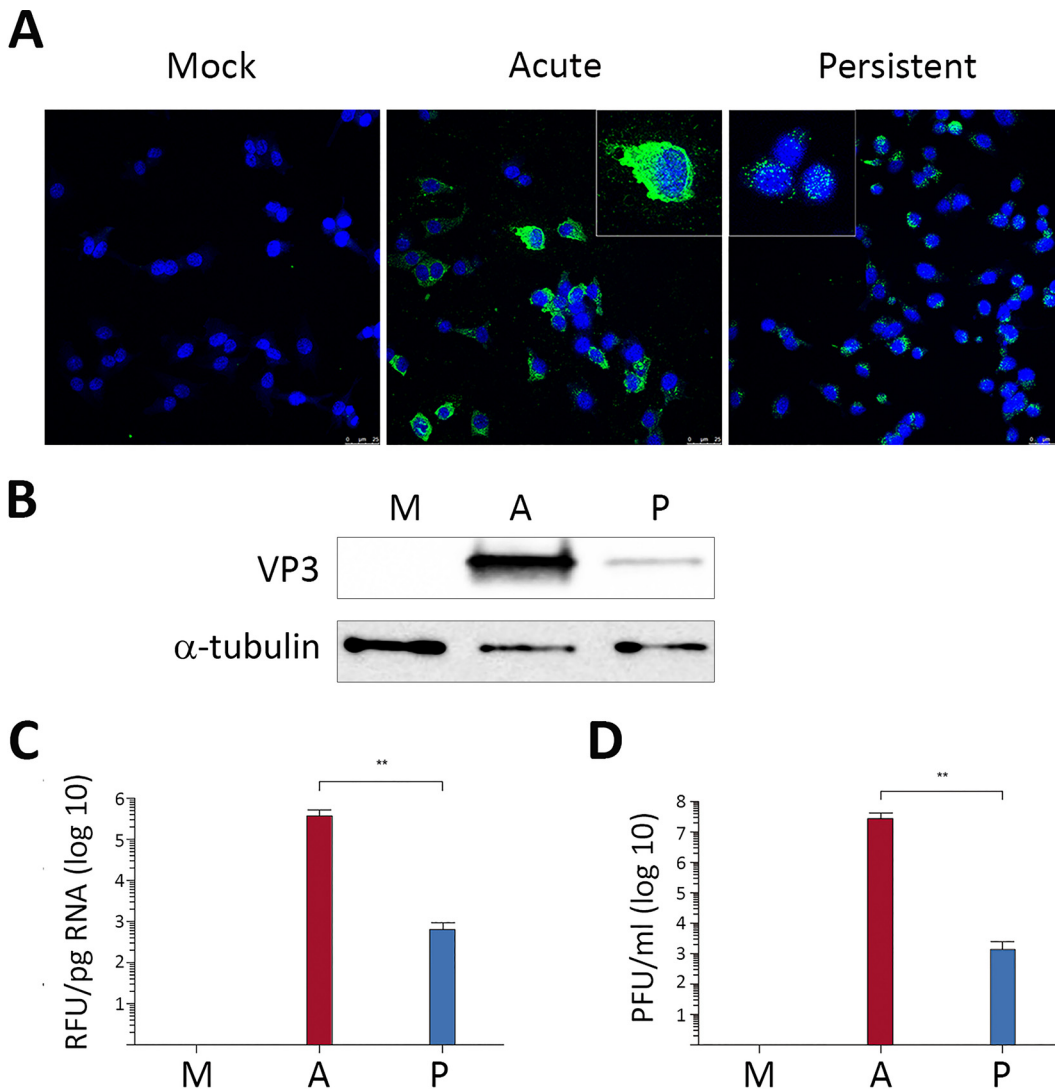


FIG 2 Characterization of persistently infected DF-1P cell cultures. Persistently infected DF-1P cell cultures (P) maintained for 180 days were used to assess the expression of virus-encoded proteins, the accumulation of viral RNAs, and the production of extracellular infectious virus. Mock (M)- and acutely infected (3 PFU/cell) DF-1 cells collected at 18 h p.i. (A) were used as controls for this analysis. (A) Cells were processed for IF microscopy using an antibody specifically recognizing the IBDV structural VP3 polypeptide. Cell nuclei (blue) were stained with DAPI. Insets show higher magnifications ($\times 2.5$) of boxed areas. (B) Cell extracts were subjected to SDS-PAGE followed by Western blotting using antibodies specifically recognizing either the IBDV structural VP3 or the cellular α -tubulin polypeptides. (C) RNAs extracted from the different cell cultures were used for RT-qPCR analysis using primers hybridizing at the VP3 coding region (genome segment A). (D) Supernatants collected from the different cell cultures were used for virus titration. Each determination was carried out in triplicate. Presented data correspond to the means \pm standard deviations from three independent experiments. Brackets indicate pairwise data comparisons. **, $P < 0.001$ as determined by two-tailed unpaired Student's *t* test.

First, cultures were processed for IF analysis using an anti-VP3 serum. As shown in Fig. 2A, all DF-1P cells showed a positive signal for this polypeptide. It is worth noting that, in contrast to the rather intense cytoplasmic immunostaining detected in acutely infected cells, the VP3 signal found in DF-1P cells was characterized by formation of small perinuclear protein accretions. In line with this observation, Western blotting revealed that the accumulation of the VP3 polypeptide in DF-1P cultures was significantly lower than that detected in acutely infected cells (Fig. 2B). We next compared the relative abundance of the IBDV RNA by reverse transcription and quantitative PCR (RT-qPCR) analysis. As shown in Fig. 2C, accumulation of IBDV RNA in DF-1P cultures was about 1,000-fold lower than that found in acutely infected cells. Similarly,

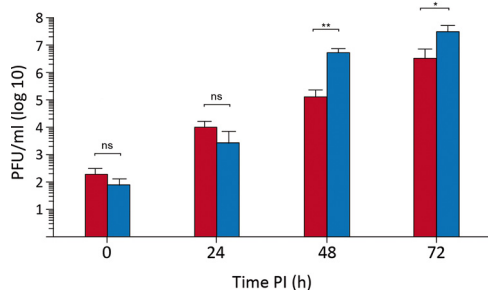


FIG 3 Replication fitness of persistent virus populations. DF-1 cell cultures were infected (0.005 PFU/cell) with supernatants from naive DF-1 cells infected with WT virus (red) or from a 180-day-old DF-1P culture (blue). Infected cell supernatants were collected at the indicated times p.i. and used for virus titration. Each determination was carried out in triplicate. Presented data correspond to the means \pm standard deviations from three independent experiments. Brackets indicate pairwise data comparisons. *, $P < 0.01$; **, $P < 0.001$; determined by two-tailed unpaired Student's *t* test. ns, not significant.

extracellular IBDV titers detected in DF-1P cell supernatants were approximately 10,000-fold lower than those found in samples from acutely infected DF-1 cells (Fig. 2D). Results obtained with the three selected DF-1P cultures were nearly identical.

Characterization of viral populations generated during persistent infection.

Results described above indicate that both virus replication and infectious virus yields detected in DF-1P cultures are exceedingly lower than those found in acutely infected DF-1 cells, suggesting that persistency entails the selection of viral populations with reduced replication fitness. To analyze this hypothesis, we first determined the nucleotide sequence of the parental (wild-type [WT]) and DF-1P virus populations (P). Comparisons of both genome segments and the three (i.e., VP5, polyprotein, and VP1) virus-encoded polypeptides then were performed (data not shown). Genome differences were minimal, having identity scores of 97.3% and 98% for segments A and B, respectively. Similarly, rather high identity scores were also detected when comparing the proteins encoded by both genomes, i.e., 97.9, 98.2, and 99.5% for VP5, polyprotein, and VP1, respectively.

The growth rates of samples collected from supernatants of naive DF-1 cells infected with WT virus or from DF-1P cells (P) were compared. Owing to the rather low infectious titers found in samples from DF-1P cells, in the range of 10^3 PFU/ml, as shown in Fig. 2, this study was performed by infecting naive DF-1 cell monolayers at a multiplicity of infection (MOI) of 0.005 PFU/cell. As shown in Fig. 3, the replication efficiency of the P virus is slightly greater, rendering extracellular infectious titers about 10-fold higher at 48 and 72 h p.i. than those detected in cells infected with the parental WT virus. Similar results were obtained with P virus populations harvested from the three independent DF-1P cultures.

Next, we sought to determine whether viral populations collected during persistency exhibited an enhanced capacity to establish new persistent infections. For this, a series of experiments were carried out by infecting (0.005 PFU/cell) naive DF-1 cell cultures with either the WT or the P virus. After 4 days, cultures were rinsed, allowed to recover for 3 weeks, and then used to determine the number of surviving clones as described above. No significant differences were found between WT- or P-infected cells, indicating that both virus populations behave similarly regarding the establishment of persistent infections in DF-1 cells (data not shown).

Elimination of infectious IBDV from DF-1P cells. In view of data presented above, it was interesting to compare the behavior of naive DF-1 and DF-1P cells. However, the presence of the persistently infecting IBDV population in DF-1P cells posed a major obstacle for this study. Accordingly, we sought to eliminate the virus using 7-deaza-2'-C-methyladenosine (7DMA), an efficient inhibitor of a wide variety of viral RNA-dependent RNA polymerases, including that encoded by IBDV (14). DF-1P cultures were maintained for 90 days in medium supplemented with $200 \mu\text{M}$ 7DMA. Thereafter, cultures

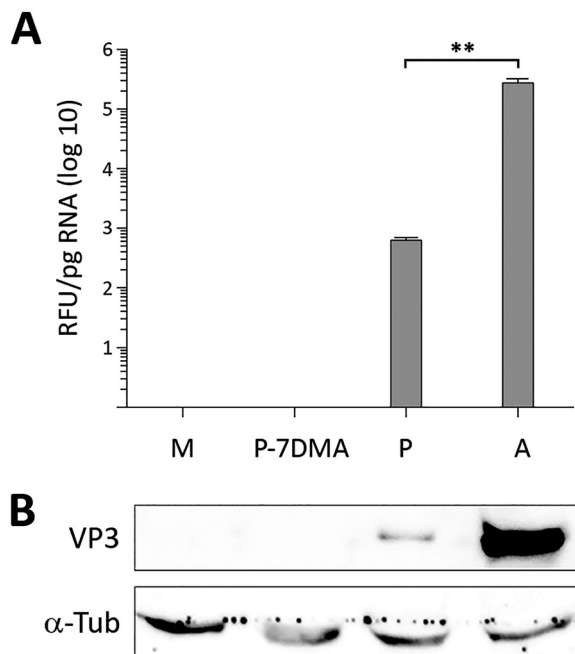


FIG 4 Elimination of infectious IBDV from DF-1P cells. Persistently infected DF-1P cultures were subjected to a prolonged (180-day) treatment with 7DMA, an inhibitor of viral RNA polymerases of RNA viruses. After the treatment, cultures were maintained for 30 days in the absence of the inhibitor to facilitate the recovery of potentially surviving IBDV populations. Thereafter, untreated (P) and 7DMA-treated (P-7DMA) DF-1P cell cultures were used to search for the presence of IBDV RNA and the structural IBDV VP3 polypeptide. Samples from mock [M]- and acutely infected DF-1 (A) cells were used as controls. (A) RNAs extracted from the different cultures were used to perform an RT-qPCR analysis using primers hybridizing at the VP3 coding region (genome segment A). Each determination was carried out in triplicate. Presented data correspond to the means \pm standard deviations from three independent experiments. Brackets indicate pairwise data comparisons. **, $P < 0.001$ as determined by two-way analysis of variance (ANOVA). (B) Cell extracts were subjected to SDS-PAGE followed by Western blotting using antibodies specifically recognizing either the IBDV structural VP3 or the cellular α -tubulin polypeptides.

were further maintained for 30 days in normal medium to allow the replication of potentially surviving infectious IBDV.

To assess the effect of the 7DMA treatment, cell extracts were used to perform RT-qPCR and Western blotting to search for the presence of IBDV-specific RNA and the VP3 polypeptide, respectively. Samples from untreated DF-1P and acutely infected (3 PFU/cell) DF-1 cells were used as controls for this analysis. As shown in Fig. 4A and B, the RT-qPCR and Western blot analyses failed to detect either IBDV-encoded RNA or the VP3 polypeptide in cultures subjected to the described 7DMA treatment. Additionally, infectious IBDV was not found in samples from cell supernatants, indicating that the treatment had effectively eliminated IBDV from DF-1P cultures. Cured DF-1P cultures here are termed DF-1PC.

DF-1PC cells exhibit an enhanced susceptibility to establishing persistent IBDV infections. At this point, it was interesting to compare the growth rate of WT IBDV in naive DF-1 and DF-1PC cell cultures. Accordingly, both cell lines were infected with WT IBDV at an MOI of 3 PFU/cell. Cell supernatants were collected at different times (i.e., 24, 48, and 72 h) p.i. and used for virus titration. As shown in Fig. 5A, no significant differences were observed on the extracellular infectious yields generated upon infection of these two cell lines.

Despite the efficient IBDV replication observed with DF-1PC cells, it was readily noticeable that the cell death induced by the infection was much lower in DF-1PC than in the parental DF-1 cell line. To quantitatively assess this initial observation, a kinetic cell death analysis was performed using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. DF-1 and DF-1PC cell monolayers were infected with WT IBDV

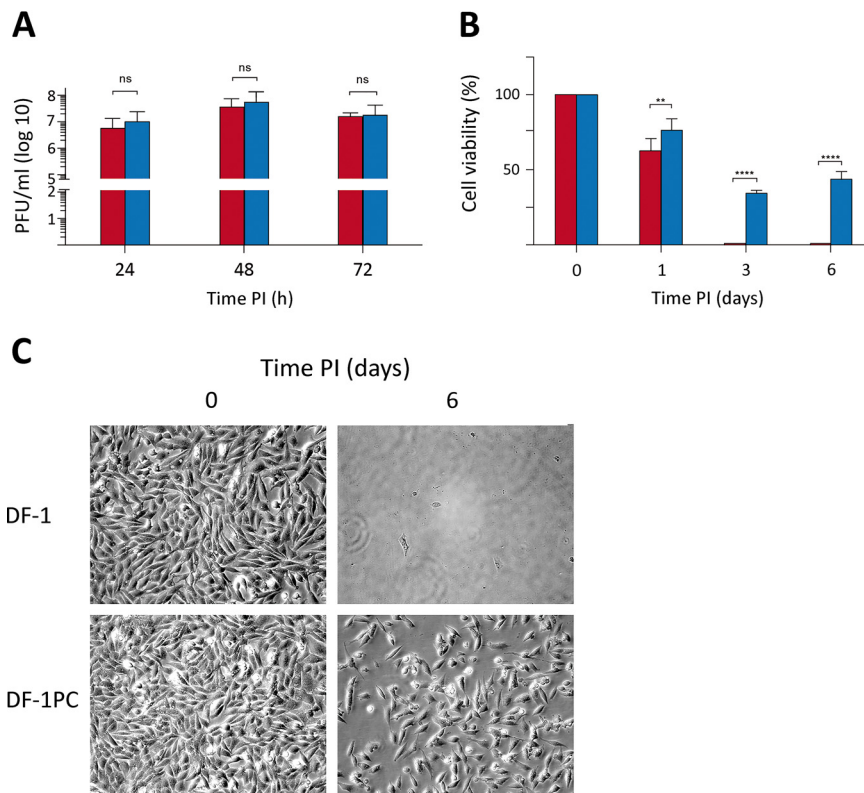


FIG 5 Comparative analysis of naive DF-1 and DF-1PC regarding their susceptibility to IBDV infection and the capacity to survive the acute infection phase. DF-1 (red) and DF-1PC (blue) cell cultures were infected with WT IBDV (3 PFU/cell). (A) Cell supernatants were harvested at the indicated times p.i. and used for virus titration. Presented data correspond to the means \pm standard deviations from three independent experiments. Brackets indicate pairwise data comparisons. ns, not significant as determined by two-way ANOVA. (B) Cell viability was determined at the indicated times p.i. using the MTT assay. Presented data correspond to the means \pm standard deviations from three independent experiments. Brackets indicate pairwise data comparisons. **, $P < 0.001$; ****, $P < 0.00001$; determined by two-way ANOVA. (C) Phase-contrast microscopy images of infected DF-1 and DF-1PC cell cultures captured at the indicated times postinfection.

(3 PFU/cell), and cell viability determined at 1, 3, and 6 days p.i., respectively. As shown in Fig. 5B, infection of parental DF-1 cells led to a swift reduction of cell viability, reaching undetectable MTT values at 3 days p.i. In contrast, the viability decline of infected DF-1PC cells was significantly less pronounced, reaching its minimal value (ca. 35%) at 3 days p.i. Furthermore, MTT values detected in infected DF-1PC cultures underwent a substantial increase at 6 days p.i., indicating that cells surviving the acute infection phase maintained the capacity to proliferate. Figure 5C shows representative phase-contrast images corresponding to IBDV-infected DF-1 and DF-1PC cultures captured at 1 h and 6 days p.i., respectively, evidencing the existence of a major difference in the capacity of these two cell lines to survive an acute IBDV infection phase. Notably, infected DF-1PC cultures reestablished fully confluent, persistently infected monolayers 8 to 10 days after the initiation of the infection.

The JAK-STAT signaling pathway is functionally blocked in DF-1PC cells. We have recently shown that type I IFN plays a crucial role in the fate of IBDV-infected cells (14). Thus, while pretreatment of cells with IFN- α induces a solid protection against IBDV replication, its addition early after infection leads to a massive apoptotic response that wipes out infected cell cultures (14).

Therefore, it was important to compare the capacity of DF-1 and DF-1PC cells to respond to type I IFN. To this end, DF-1 and DF-1PC cultures were left untreated or were treated with IFN- α (1,000 IU/ml) for 16 h. Thereafter, cultures were incubated with

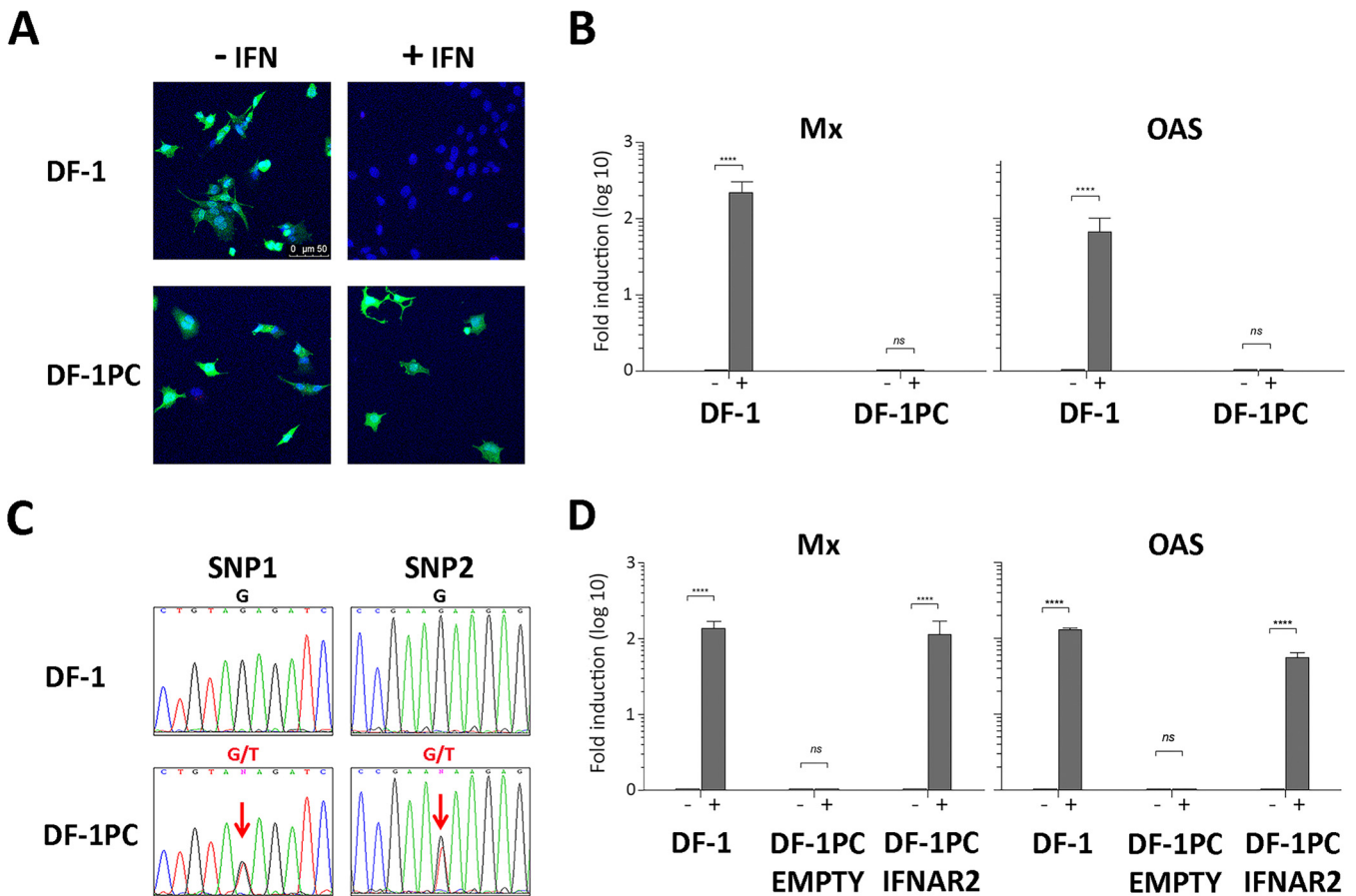


FIG 6 Capacity of naive DF-1 and DF-1PC cells to respond to chicken IFN- α . (A and B) DF-1 and DF-1PC cell cultures were treated with IFN- α (1,000 IU/ml) (+IFN) or left untreated (-IFN) for 16 h. Cultures were then used to assess their susceptibility to VSV infection or the expression of the Mx and OAS ISGs. (A) Cultures were infected (1 PFU/cell) with VSV-GFP expressing the GFP polypeptide. At 12 h p.i., cultures were incubated with DAPI to stain cell nuclei and then observed under fluorescence microscopy. (B) Cultures were harvested and subjected to RNA extraction. Mx and OAS expression levels were determined by RT-qPCR. Presented data correspond to the means \pm standard deviations from three independent experiments. Brackets indicate pairwise data comparisons. ****, $P < 0.00001$ as determined by two-way ANOVA. ns, not significant. (C) Detection of single-nucleotide polymorphisms in IFNAR exon 10. Genomic DNA isolated from DF-1 and DF-1PC cell cultures was subjected to PCR using oligonucleotides OL_IFNAR2.1 and OL_IFNAR2.2. The resulting amplicons, spanning the region of interest of IFNAR2 exon 10, were subjected to conventional Sanger sequencing using the same oligonucleotides. Panels show sequencing chromatogram regions of interest (holding DF-1PC SNPs) from DF-1 and DF-1PC amplicons, respectively. Lettering above chromatograms corresponds to detected nucleotides, namely, A (green), C (blue), G (black), and T (red). Sequence ambiguities (G/T) are indicated as N (magenta). (D) DF-1PC cells were transfected with pCI-neo/chIFNAR2-FLAG, a mammalian expression vector expressing a full-length version of the chicken IFNAR2 gene (DF-1PC IFNAR2). Control DF-1PC cultures were transfected with the pCI-neo parental vector (DF-1PC Empty). At 24 h posttransfection, cultures were treated with 1,000 IU of IFN- α (+) or left untreated (-) for 16 h. IFN-treated and untreated DF-1 cell cultures were used as additional controls for these experiments. RNA isolated from the different cell cultures was used to assess the transcriptional activation of the Mx and OAS genes by RT-qPCR. Presented data correspond to the means \pm standard deviations from three independent experiments. Brackets indicate pairwise data comparisons. ****, $P < 0.00001$ as determined by two-way ANOVA. ns, not significant.

a recombinant vesicular stomatitis virus expressing the green fluorescent protein (VSV-GFP) (1 PFU/cell). VSV is extremely sensitive to the antiviral response induced by type I IFNs, providing a simple assay to assess IFN responsiveness. At 12 h p.i., cultures were incubated with DAPI to stain cell nuclei and then visualized using fluorescence microscopy to detect GFP expression (Fig. 6A). As expected, untreated DF-1 cells showed an intense GFP signal, indicating that they were efficiently infected with VSV-GFP. In contrast, IFN- α -treated DF-1 cells were fully protected, as evidenced by the absence of a fluorescent GFP signal. Interestingly, both untreated and IFN- α -treated DF-1PC showed an intense green fluorescence revealing the VSV-GFP infection, indicating the incapacity of this cell line to respond to IFN- α .

To further verify this finding, an alternative approach was used. DF-1 and DF-1PC monolayers were left untreated or were treated with IFN- α (1,000 IU/ml) for 16 h and then used to extract cellular RNA. These RNA samples were used to perform RT-qPCR

analyses to check the transcriptional activation of two interferon-stimulated genes (ISG), i.e., Mx and 2',5'-oligoadenylate synthetase (OAS), generally used as activation markers of the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription protein (JAK-STAT) signaling pathway (15). As shown in Fig. 6B, DF-1 cells efficiently responded to the IFN- α treatment, triggering a strong transcriptional activation of both Mx and OAS genes. In contrast, basal Mx and OAS RNA levels were detected in both treated and untreated DF-1PC cells. These results further confirmed the incapacity of the DF-1PC cell line to respond to IFN- α .

Genetic analysis of DF-1 and DF-1PC cells. The avian JAK-STAT signaling pathway is relatively simple, encompassing a reduced number of protein components (reviewed in reference 16). Despite this apparent simplicity, there are many potential mutations capable of impairing the pathway's functionality. In view of this, high-throughput next-generation sequencing (NGS) was used to perform a whole sequencing analysis of the DF-1 and DF-1PC cell genomes as described in Materials and Methods.

Assembled DF-1 and DF-1PC genomes were annealed to the *Gallus gallus* (red junglefowl breed isolate RJF number 256 [GenBank accession number [GRCg6a](#)]) genome. Both assembled genomes cover over 98% of the reference genome with an average sequencing depth of 35 \times (data not shown). Next, DF-1 and DF-1PC exomes were compared to the reference chicken exome to detect differential single-nucleotide polymorphisms (SNPs), insertions, and deletions. Differential insertions or deletions at the DF-1 and DF-1PC exomes were not found. However, the analysis led to the detection of two SNPs exclusively found within the DF-1PC exome. Both SNPs consisted of a thymidine (T)-to-guanine (G) substitution at nucleotide positions 106,590,841 (SNP1) and 106,591,114 (SNP2), respectively. SNP1 and -2 were found within 57% and 46%, respectively, of DF-1PC sequencing reads spanning the described nucleotides.

Both DF-1PC-specific mutations map at chromosome 1 (NCBI reference sequence NC_006088.05) within the last exon (exon 10) of the gene encoding the IFN- α/β receptor subunit 2 (IFNAR2) (GenBank accession number [AF082665.1](#)) (17).

To confirm NGS sequencing data, amplicons spanning the IFNAR2 exon 10 region holding both mutations were generated by PCR using genomic DNA isolated either from DF-1 or DF-1PC cells as templates. Oligonucleotides OL_IFNAR2.1 (5'-CCATCCC ATCAGCCTGGAAAT) and OL_IFNAR2.2 (5'-TGCACATTGCCAGTCAACAG), hybridizing at nucleotide positions 660 to 688 and 1349 to 1368, respectively, of the IFNAR2 DNA were used as PCR primers. DF-1- and DF-1PC-derived amplicons were subjected to conventional nucleotide sequencing analysis using oligonucleotides OL_IFNAR2.1 and OL_IFNAR2.2. As shown in Fig. 6C, the presence of double nucleotide (G/T) signals at SNP1 and -2 positions in chromatograms from DF-1PC amplicons fully confirmed NGS data. As expected, amplicons derived from DF-1 genomic DNA presented single (G)-nucleotide signals at equivalent positions.

At this point, it was important to determine whether the detected mutations were homo- or heterozygous. To answer this question, the DF-1PC amplicon was cloned into the pGEM-T Easy plasmid vector. Thereafter, recombinant plasmids purified from 20 independent ampicillin-resistant *Escherichia coli* colonies were purified and used for nucleotide sequencing using the above-described primers. All analyzed plasmids contained single mutations, 9 of them harboring SNP1 and the remaining 11 SNP2. These results indicate that mutations are heterozygous, with each DF-1PC IFNAR2 allele containing a single G/T substitution at different exon 10 positions.

The three persistently infected DF-1PC cell lines were shown to harbor the same mutations, indicating that both mutations were already present before the 7DMA treatment.

DF-1PC cells encode C-terminally truncated IFNAR2 polypeptides. The chicken IFNAR2 gene encodes the IFNAR2 protein precursor, a polypeptide (508 residues) encompassing a signal peptide that is removed during its transport to the cell membrane. Mature IFNAR2 is a type I transmembrane polypeptide including an N-terminal ectodomain (216 residues), a transmembrane region (20 residues), and a cytoplasmic domain (246 residues). The ectodomain is responsible for the interaction of the protein

with its cognate cytokine ligands and the subsequent assembly of ternary receptor complexes with IFNAR1. IFNAR1 and IFNAR2 cytoplasmic domains are accountable for the propagation of the activation signal to effector proteins, i.e., JAK, STAT1, and TYK2 (reviewed in reference 18).

The G-to-T nucleotide substitutions found in IFNAR2 of DF-1P and DF-1PC cells transform GAT and GAA codons, encoding two glutamic acid (E) residues, i.e., E301 and E392, into TAG and TAA translation termination codons, respectively. Indeed, these mutant IFNAR2 genes encode C-terminal truncated IFNAR2 polypeptides lacking either 107 or 208 residues, respectively. Unfortunately, the lack of specific antibodies recognizing the chicken IFNAR2 polypeptide prevented visualization of the truncated proteins.

The ablation of the IFNAR2 cytoplasmic domain, essential for the transduction of the JAK-STAT activation signal (19), would explain the incapacity of DF-1PC cells to respond to type I IFN. To confirm this prediction, we sought to determine whether the ectopic expression of a full-length version of the IFNAR2 polypeptide rescues IFN- α responsiveness. Hence, a recombinant version of the chicken IFNAR2 gene was synthesized and cloned into the expression vector pCI-neo, generating the pCI-neo/chIFNAR2-Flag plasmid. DF-1PC cells were transfected either with empty pCI-neo or pCI-neo/chIFNAR2-FLAG. At 24 h posttransfection, cultures were left untreated or treated with 1,000 IU of IFN- α for 16 h and then used for RNA extraction. RNA samples were used to assess Mx and OAS transcription by RT-qPCR. RNAs from treated and untreated DF-1 cell cultures were used as controls. As shown in Fig. 6D, while pCI-neo-transfected DF-1PC cultures did not respond to the treatment, those transfected with pCI-neo/chIFNAR2-FLAG readily reacted to IFN- α , triggering a ca. 100-fold increase in the expression of both ISGs. These results indicate that the ectopic expression of the full-length recombinant IFNAR2-Flag protein restores the functionality of the JAK-STAT pathway in DF-1PC cells. Additionally, these results ruled out the existence of potentially undetected genetic alterations also affecting the functionality of this pathway.

In view of these results, we decided to analyze the responsiveness to IFN- α of cells that remain alive from an acute IBDV infection. For this, cell islets generated after a 21-day recovery period following the acute IBDV infection were treated with 1,000 IU of IFN- α for 16 h and then challenged with VSV-GFP as described above. Nearly 60% of the islets were protected against VSV infection, indicating they are still responsive to IFN (data not shown). Taken together, our results suggest that the early surviving IFN-responsive persistently infected cells keep dying over time during continuous cell passaging, and that only cells defective in the JAK-STAT pathway subsist indefinitely.

Effect of the impairment of the JAK-STAT pathway on the establishment of IBDV persistent infections on human HeLa cells. We have shown that the inactivation of the JAK-STAT pathway significantly lessens IBDV-induced cell death in avian DF-1 cells and enhances their susceptibility to initiate persistent infections. It was important to ascertain whether or not this is a general trait also operating in other IBDV-susceptible cells. Concerning this, Urin et al. (20) have recently described the generation of a set of human HeLa knockout (KO) cell lines selectively lacking every gene participating in the JAK-STAT pathway. We borrowed the HeLa IFNAR2 KO line, unable to respond to type I IFN, to analyze the effect that the functional inactivation of the JAK-STAT pathway may have on the fate of IBDV-infected HeLa cells.

We first compared the death rate of parental (WT) and IFNAR2 KO cells induced by the IBDV infection using the MTT cell viability assay. Cell monolayers were infected (3 PFU/cell), and cell viability was determined at 1, 3, and 6 days p.i. As shown in Fig. 7A, the behavior of both cell lines was strikingly different. WT cells were swiftly killed by the infection, reaching viability values nearing 0% at 6 days p.i. In contrast, the viability of infected IFNAR2 KO HeLa cells remained largely unaltered at the beginning of the infection (1 to 3 days p.i.) and grew at later times, reflecting the capacity of infected cells to proliferate. In line with this observation, infected IFNAR2 KO cells readily became persistently infected. As is the case with DF-1P cells, persistently infected IFNAR2 KO HeLa cells also showed a reduced accumulation of the IBDV VP3 polypeptide compared to acutely infected cells (Fig. 7B).

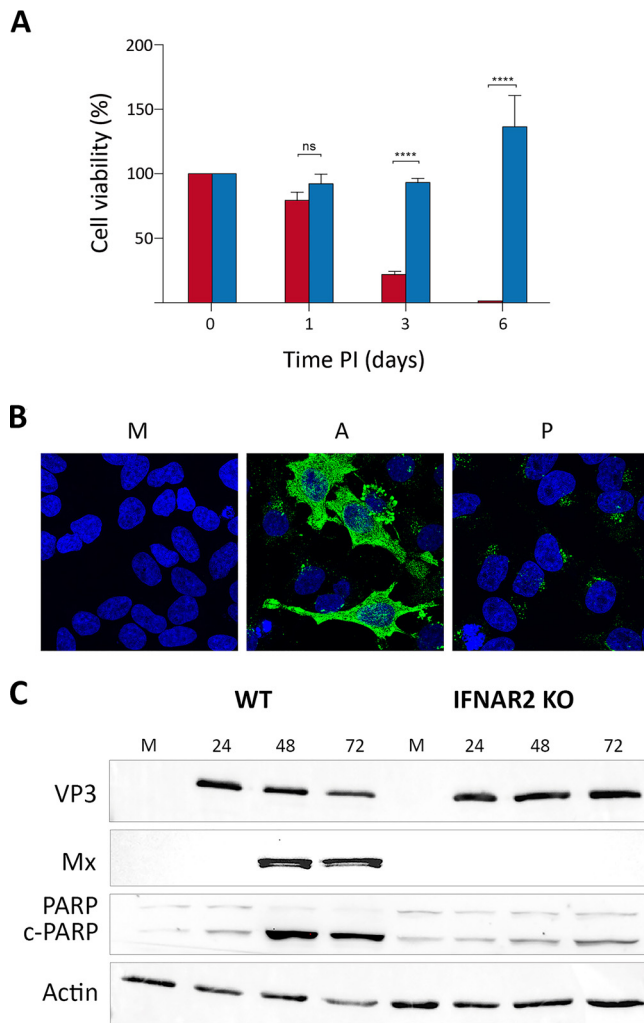


FIG 7 Effect of the inactivation of the JAK-STAT pathway on the fate of IBDV-infected HeLa cells. (A) WT (red) and IFNAR2 KO HeLa (blue) cell cultures were infected with WT IBDV (3 PFU/cell). Cell viability was determined at the indicated times p.i. using the MTT assay. MTT values recorded immediately after infection were considered 100% cell viability. Presented data correspond to the means \pm standard deviations from three independent experiments. Brackets indicate pairwise data comparisons. ****, $P < 0.00001$ as determined by two-way ANOVA. ns, not significant. (B) Persistently infected IFNAR2 KO cells (P) maintained for 2 months were processed for IF analysis using an antibody specifically recognizing the IBDV structural VP3 polypeptide. Cell nuclei (blue) were stained with DAPI. Mock-infected (M) and acutely infected (3 PFU/cell, fixed at 48 h p.i.) (A) cells were used as controls. (C) Infected (3 PFU/cell) WT and IFNAR2 KO cell cultures were collected at the indicated times p.i. Mock-infected (M) cell cultures were used as controls. The corresponding extracts were subjected to SDS-PAGE followed by Western blotting using antibodies against the virus-encoded VP3 and the cellular Mx, PARP, and actin proteins. The PARP cleavage product is denoted c-PARP.

To further assess the differential behavior of WT and IFNAR2 KO HeLa cells, Western blotting was performed using cell extracts collected at different times p.i. (i.e., 24, 48, and 72 h). Samples from mock-infected cells were used as controls. As shown in Fig. 7C, both WT and IFNAR2 KO HeLa cells were readily infected with IBDV, showing similar VP3 accumulation levels at 24 h p.i. As expected, while infection of WT cells efficiently triggered robust Mx protein expression, infected IFNAR2 KO cell extracts were void of this protein, confirming their incapacity to activate the type I IFN-mediated gene expression in response to IBDV infection. The proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) is generally used as an early apoptotic marker (21). Accordingly, we monitored PARP cleavage to compare the apoptotic response of infected WT and IFNAR2 KO cells. As expected, infection of WT cells resulted in a conspicuous PARP

cleavage, detectable from 24 h p.i. onwards. In contrast, this effect was significantly abridged in IFNAR2 KO cells, showing a rather modest increase of the cleaved PARP (c-PARP) product at 72 h p.i. Consistent with the observed apoptotic induction observed in WT HeLa cells, the amount of both VP3 and the cellular actin polypeptide, used as a protein loading control in this experiment, was significantly reduced in WT-infected cells collected at 72 h p.i.

Taken together, these results show that, similar to what had been found in DF-1 cells, the obliteration of the JAK-STAT signaling pathway significantly enhances the capacity of HeLa cells to survive the acute infection phase and facilitates the establishment of IBDV persistent infections.

DISCUSSION

Although infection of DF-1 cells with IBDV results in massive cell death, a minor, yet consistent, cell fraction endures the acute infection phase, giving rise to a collection of persistently infected cell clones, holding from 10 to several thousand cells at 21 days p.i. This initial size variation suggests the existence of major differences in the capacity of surviving cells to withstand IBDV replication. Our results indicate that continuous cell passaging progressively narrows down the initial heterogeneity. Hence, although persistently infected cultures described here were not subjected to cell cloning, genome sequencing data showed that the three DF-1P lines characterized during our study share identical mutations on the IFNAR2 gene, suggesting that they originated from a preexisting DF-1 cell subset already holding these mutations.

It seems reasonable to hypothesize that the long-term passaging of persistently infected cultures enables a Darwinian process resulting in the selection of clonal cell populations harboring the fittest genotype to sustain proliferation while enduring a significantly lessened, yet productive, IBDV replication. Indeed, the repeated selection of persistently infected cell clones incapable of responding to type I IFN described here underscores the crucial role of the innate antiviral cell response and, in particular, that of the JAK-STAT pathway on the fate of IBDV-infected cells.

Virus replication taming, an IBDV persistency hallmark. As evidenced in different virus-cell systems, persistent viral infections require the successful interplay of cellular and viral mechanisms capable of sustaining a precise equilibrium between virus replication and cell proliferation. The modulation of virus replication is a common finding in persistent infections, likely being a requirement for the initiation of persistency (22).

A comparison of elemental virus replication parameters (i.e., virus yield and genome and protein accumulation) performed in acute and persistent IBDV infections indicates that persistency entails a major downregulation of virus replication. IBDV downregulation could have been associated with the selection during the initial stages of the persistency of a virus population(s) exhibiting reduced replication fitness. However, contrary to this simple notion, viruses harvested from persistently infected DF-1 cells showed an enhanced replication capacity compared to the WT parental virus. A similar situation was found during the characterization of BHK-21 cells persistently infected with foot-and-mouth disease virus (FMDV; *Picornaviridae*), where it was shown that FMDV became progressively more virulent upon serial passages of persistently infected cells (23). In both cases, IBDV and FMDV, persistency results in the selection of virus populations exhibiting enhanced fitness. Nonetheless, we cannot rule out that the higher titers detected in cells infected with the virus from persistently infected cells might be due to higher viability of these cells compared with those infected with the WT virus.

Although the possible implication of other genetic elements, e.g., microRNAs (24), cannot be ruled out at this point, data gathered from a wide variety of viruses, including birnaviruses, suggest that the downregulation of IBDV replication is related to the presence of defective virus genomes (DVGs). These aberrant genomes, arising from errors during the replication of many viruses, retain the replication capacity of standard

viral genomes. It has been extensively documented that DVGs interfere with the replication of parental viruses, thereby contributing to the establishment of persistent infections both *ex* and *in vivo* (25, 26).

The role of the JAK-STAT pathway. The type I IFN-dependent antiviral response entails two interrelated signaling cascades known as transactivation and JAK-STAT pathways. The transactivation pathway, involving a large number of sentinel and effector proteins, is activated by the presence of pathogen-associated molecular patterns (e.g., nucleic acids, proteins, or lipids) at different cell compartments, triggering the expression of type I IFNs as well as an ISG subset, including IFN response factors, pattern recognition receptors, and some antiviral effectors (16). Although, for the sake of concision, data concerning the transactivation capacity of DF1-PC and HeLa are not presented in this report, we have documented that this pathway remains fully functional in both DF-1PC and HeLa IFNAR2 KO cell lines.

Upon their release from infected cells, IFNs interact with both uninfected and infected cells. This interaction activates the JAK-STAT pathway, triggering the expression of the whole ISG set and the concomitant implementation of the antiviral defense program in uninfected bystander cells. However, it has also been well documented that the concurrent activation of both type I IFN pathways induces a vigorous apoptotic response that eliminates virus-infected cells (reviewed in reference 27). Indeed, the comparative analysis performed with DF-1 and DF-1PC cells indicates that the functional inactivation of the JAK-STAT pathway significantly reduces the apoptotic response induced by the infection, strongly affecting IBDV-induced death rates. Thus, while MTT cell viability values recorded in WT-infected DF-1 cells become negligible at 72 h p.i., approximately 30% of infected DF-1PC cells remain alive at this time. A comparison of data corresponding to the recovery of persistently infected cell clones generated upon infection of naive DF-1 cells, 0.023% of the total infected population, with 30% cell survival recorded in infected DF-1PC populations, indicates that the inactivation of the JAK-STAT pathway enhances over 1,000-fold the capacity of DF-1 cells to survive the acute IBDV infection phase.

Results obtained with WT and IFNAR2 KO HeLa cells nicely recapitulate the differential behavior detected in infected DF-1 and DF-1PC cells, showing again that the inactivation of the JAK-STAT pathway affords a striking increase of the capacity of infected cells to survive the acute infection phase and to initiate persistent infections. In line with previous reports, results presented here show that the death of IBDV-infected cells is directly related to the apoptotic response triggered by the infection, and that this is largely owed to the activity of type I IFNs. Indeed, a major conclusion of our study is that type I IFNs act as a major barrier preventing the establishment of IBDV persistent infections.

As stated above, IBDV replication in HeLa cells is significantly slower than that in DF-1 cells. A major difference is also evident in the production of infectious virus yields, being significantly higher (15- to 20-fold) in DF-1 cells. Interestingly, despite the fact that both cell lines, DF1-PC and HeLa IFNAR2 KO, share the inability to respond to type I IFN, the efficiency with which HeLa IFNAR2 KO cells develop persistent infections is significantly higher than that observed in DF-1PC cells. This observation suggests the existence of an inverse correlation between replication efficiency and the proneness to establishing persistent infections.

Although IgM-bearing chicken bursal lymphocytes are the main IBDV cell target, it has been shown that, with a much lower efficiency, the virus also replicates in cells of the monocyte-macrophage lineage (28). It is tempting to speculate that this cell lineage plays a role in the establishment of *in vivo* persistent infections, as was previously suggested (9, 28, 29).

Additional factors contributing to the apoptotic response in IBDV-infected cells. Our data indicate that the functional disruption of the JAK-STAT pathway does not completely preclude IBDV-mediated apoptosis, suggesting that another factor(s) associated with IBDV replication processes also contributes to this phenomenon.

It can be envisaged that the hefty accumulation of both virus double-stranded RNA and proteins and the assembly of huge cytoplasmic arrays holding thousands of

closely packed virions, along with the appropriation of the biosynthetic machinery during the acute IBDV infection phase, can significantly alter cellular homeostasis, affording additional proapoptotic stimuli. Regarding this, the availability of IFN- α/β -unresponsive DF-1PC and HeLa IFNAR2 KO cells might help in the identification of other factors, viral and/or cellular, contributing to the obliteration of IBDV-infected cells. Indeed, both cell lines provide a powerful tool to further dissect the molecular bases of the IBDV-induced cellular pathogenesis.

Concluding remarks. As recently evidenced with Ebola virus (EBOV), persistently infected asymptomatic individuals support the long-term maintenance and resurgence of EBOV epidemics in apparently virus-free geographical areas (30). Regarding IBDV, the relentless reemergence of virus outbreaks, even in areas under intense vaccination programs and strict hygienic measures, suggests the existence of undetected virus reservoirs. Indeed, persistently infected birds might play an important role in IBDV epidemiology. Hopefully, data presented here might help in stimulating interest in this largely overlooked phenomenon.

MATERIALS AND METHODS

Cells, viruses, and infections. DF-1 (chicken embryonic fibroblasts, ATCC number CRL-12203) and HeLa (human epithelial cervical cancer cells) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/ml), and 5% fetal calf serum (FCS) (Sigma). IBDV infections were performed on preconfluent (ca. 75%) cell monolayers with the Soroa strain, a cell-adapted serotype 1 virus, diluted in DMEM at an MOI of 3 PFU per cell, unless otherwise stated. After adsorption (1 h, 37°C), the medium was replaced with fresh DMEM supplemented with 2% FCS. Infected cultures were maintained at 37°C. Infections with the recombinant stomatitis vesicular stomatitis virus expressing the GFP protein (VSV-GFP) (31) were performed in the same way.

Virus titrations. For IBDV titrations, supernatants from cultures infected with IBDV were collected and subjected to centrifugation (5,000 \times g for 5 min) at 4°C to remove cell debris. Clarified cell supernatants were used to determine extracellular virus titers by plaque assay using semisolid agar overlays followed by immunostaining as previously described (32).

IFN- α . The recombinant chicken IFN- α used in our experiments was expressed, purified, and titrated in our laboratory as previously described (14).

Light microscopy. Cell cultures grown onto glass coverslips were washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma) for 30 min, and then extensively rinsed with PBS. Cells were permeabilized by incubation with PBS containing 0.5% Triton X-100 (Sigma) for 5 min. Coverslips were blocked for 20 min using a solution of PBS containing 5% FCS and then incubated with a rabbit anti-VP3 serum (33) for 18 h at 4°C. Thereafter, coverslips were repeatedly washed in PBS and incubated with goat anti-rabbit IgG coupled to Alexa-488 diluted in PBS supplemented with 1% FCS for 45 min at 20°C. Cell nuclei were stained with 2-(4-aminophenyl)-6-indolecarbamidine dihydrochloride (DAPI; Sigma) diluted in PBS for 30 min at 20°C. Finally, coverslips were dehydrated with ethanol and mounted with ProLong antifade reagent (Invitrogen). Cells infected with VSV-GFP were washed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma) for 30 min, and after an extensive wash with PBS, cell nuclei were stained as described above. Samples were visualized by epifluorescence using a Leica TCS-Sp5 microscope confocal system. Fluorescent signals detected by confocal laser scanning microscopy were recorded separately by using appropriate filters. Images were captured using the LASAF v.2.6.0 software package (Leica Microsystems).

Western blotting. Samples used for Western blot analyses were prepared by removing media from cell monolayers and then suspending cells in ice-chilled disruption buffer (0.5% Triton X-100, 50 mM KCl, 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1 mM EDTA, 10% glycerol, complete protease inhibitor cocktail [Roche]). Samples were mixed (vol/vol) with 2 \times Laemmli's sample buffer and heated at 95°C for 5 min before electrophoresis. Electrophoreses were performed on 12% polyacrylamide gels. Gels were subjected to electroblotting onto Hybond-C nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in PBS for 1 h at room temperature and then incubated for 18 h at 5°C with the appropriate antisera. Thereafter, membranes were extensively washed with PBS and incubated with the corresponding secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (HRP). Immunoreactive bands were detected by chemiluminescence (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent). Antibodies used in our experiments are listed in Table 1.

RT-qPCR analysis. Total RNA was isolated by using the Macherey-Nagel NucleoSpin RNA plus XS kit (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Purified RNAs (300 to 500 ng) were reverse transcribed into cDNA by using SuperScript III (Invitrogen) reverse transcriptase and random primers. The resulting cDNA samples were subjected to qPCR using the gene-specific primers listed in Table 2. Reactions were performed in triplicate by using Power SYBR green PCR master mix (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's protocol and by using an Applied Biosystems 7500 real-time PCR system instrument. Reactions were performed with steps of 2 min at 50°C; 10 min at 95°C; 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C; and finally, 15 s at 95°C, 1 min at 60°C, 30 s at 95°C, and 15 s at 60°C to build the melt curve. Gene expression levels were normalized to the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene, and the results were calculated as fold

TABLE 1 List of antibodies used for Western blotting

Protein	Source	Designation
Actin	Santa Cruz Biotechnology	sc-47778
Tubulin	Cell Signaling	2125
PARP	Cell Signaling	9542S
Mx	Abcam	ab95926
Mouse IgG HRP conjugate	Merck	A4416
Rabbit IgG HRP conjugate	Merck	A0545

changes in gene expression relative to mock-infected cells by using the delta-delta C_T (threshold cycle) method of analysis.

Cell viability assays. Cell viability was determined using the MTT assay kit (Abcam), based on the conversion of water-soluble 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to an insoluble formazan product, by following the manufacturer’s instructions. Cell monolayers were incubated for 3 h with DMEM supplemented with the MTT reagent. After this period, cell medium was replaced by plain DMEM and further incubated for 30 min. Thereafter, media were replaced by dimethyl sulfoxide (DMSO) and maintained for 15 min. All incubations were carried out in the dark under normal culture conditions (37°C, 5% CO₂). Finally, samples were harvested and used to determine the absorbance (Abs) at 570 nm. The percentage of viable cells was determined using the following equation: % viable cells = $(Abs_{sample} - Abs_{blank}) / (Abs_{control} - Abs_{blank}) \times 100$. Controls correspond to cell cultures collected at the beginning of the experiment. Blank corresponds to empty culture wells.

IBDV genome sequencing. Complete genome sequencing of viruses was performed as previously described (34), with minor modifications. Briefly, viral RNA was extracted from either DF-1 cultures infected with the WT virus or DF-1P cells using the QIAamp viral RNA minikit (Qiagen) according to the manufacturer’s instructions. Each segment genome segment was RT-PCR amplified in two fragments using previously described primers (34). Full-length sequencing of each segment was performed in both directions on three independently produced PCR products.

High-throughput cell genome analysis. Genomic DNA was isolated from DF-1 and DF-1PC cell cultures using the Wizard genomic DNA purification kit by following the manufacturer’s instructions. A total amount of 1.5 μg DNA per sample was used as the input material for the DNA sample preparations. Sequencing libraries were generated using a TruSeq library construction kit (Illumina) by following the manufacturer’s recommendations, and index codes were added to attribute sequences to each sample. Briefly, the DNA samples were fragmented by sonication to a size of 350 bp, end polished, A tailed, and ligated with the full-length adaptor for Illumina sequencing with further PCR amplification. After the library was constructed, a preliminary quantification was performed using Qubit 2.0 (ThermoFisher Scientific), and the library concentration was diluted to 1 ng/μl. The libraries then were analyzed for size distribution using an Agilent2100 Bioanalyzer and quantified using real-time PCR. After the library was qualified, library preparations were sequenced on an Illumina HiSeq platform and paired-end reads were generated. The original data obtained from the high-throughput sequencing were transformed to sequenced reads by base calling. Raw data were recorded in a FASTQ file containing sequenced reads and corresponding sequencing quality information. The sequenced reads were filtered to remove low-quality reads and adapters. After this process, clean reads were mapped to the reference genome for subsequent variation analysis. The bwa software (35) was used for the comparison of short reads obtained from high-throughput sequencing to the *Gallus gallus* (red junglefowl breed isolate RJF number 256 [GenBank accession number [GRCg6a](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GRCg6a)]) genome. The position of clean reads on the reference genome was determined by alignment, and the information, such as the depth of sequencing of the samples and the genome coverage, were counted and used for variation detection. Individual SNPs and insertions-deletions (InDels) were detected using SAMTOOLS (36) and annotated using the ANNOVAR software (37). Library construction, high-throughput sequencing, sequence alignments, and SNP and InDel detection and annotations were performed by CD Genomics (NY, USA).

PCR cloning and sequencing. Genomic DNA fragments generated by PCR were cloned into the pGEM-T Easy plasmid vector using the pGEM-T Easy vector system (Promega) by following the manufacturer’s instructions. Cloned DNAs were subjected to nucleotide sequencing using the SP6 and T7 sequencing primers.

TABLE 2 List of primers used for RT-qPCR

Gene	Forward primer (5’–3’)	Reverse primer (5’–3’)
Chicken Mx	TTCACGTCAATGTCCCAGCTTTGC	ATTGCTCAGGGCTTTACTTGCTCC
Chicken GADPH	ATCAAGAGGGTAGTGAAGGCTGCT	TCAAAGGTGGAGGAATGGCTGTCA
Chicken OAS	GCAGAAGAACCTTTGTGAAGTGGC	TCGGCTTCAACATCTCCTTGATACC
IBDV segment A	AAGGGCAGCTACGTCTGATCTAC	TGGCAACTTCGTCTATGAAAGC

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful for the excellent technical assistance provided by Antonio Varas and the work of Silvia Gutiérrez-Erlandsson and Ana M. Oña from the Advanced Light Microscopy scientific CNB service. We are also extremely grateful to Gideon Schreiber for generously sharing the WT and IFNAR2-KO HeLa cell lines.

This work was supported by grants AGL2014-60095-P and AGL2017-87464-C2-1-P (AEI/FEDER, UE) to D.R. and J.F.R., L.L.C-G., E.D.-B., and D.F. were supported by predoctoral research contracts from the International Fellowship Program of the Caixa Foundation, by the FPU Program of the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities (FPU 18/01873), and by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (BES-2015-073589), respectively. O.C.-R. was supported by a contract from the Consejería de Juventud y Deporte de la Comunidad Autónoma de Madrid (PEJD-2017-PRE/BIO-5006). The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

REFERENCES

- Morrison LA, Fields BN, Dermody TS. 1993. Prolonged replication in the mouse central nervous system of reoviruses isolated from persistently infected cell cultures. *J Virol* 67:3019–3026. <https://doi.org/10.1128/JVI.67.6.3019-3026.1993>.
- Borzakian S, Pelletier I, Calvez V, Colbere-Garapin F. 1993. Precise mis-sense and silent point mutations are fixed in the genomes of poliovirus mutants from persistently infected cells. *J Virol* 67:2914–2917. <https://doi.org/10.1128/JVI.67.5.2914-2917.1993>.
- Delmas D, Attoui H, Ghosh S, Malik YS, Mundt E, Vakharia VN, Ictv Report Consortium. 2019. ICTV virus taxonomy profile: *Birnaviridae*. *J Gen Virol* 100:5–6. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001185>.
- van Cleef KWR, van Mierlo JT, Miesen P, Overheul GJ, Fros JJ, Schuster S, Marklewitz M, Pijlman GP, Junglen S, van Rij RP. 2014. Mosquito and *Drosophila* entomobirnaviruses suppress dsRNA- and siRNA-induced RNAi. *Nucleic Acids Res* 42:8732–8744. <https://doi.org/10.1093/nar/gku528>.
- MacDonald RD, Kennedy JC. 1979. Infectious pancreatic necrosis virus persistently infects chinook salmon embryo cells independent of interferon. *Virology* 95:260–264. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(79\)90428-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(79)90428-8).
- Riji John K, Richards RH. 1999. Characteristics of a new birnavirus associated with a warm-water fish cell line. *J Gen Virol* 80:2061–2065. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-8-2061>.
- van den Berg TP, Etteradossi N, Toquin D, Meulemans G. 2000. Infectious bursal disease (Gumboro disease). *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 19:527–543.
- Abdel-Alim GA, Saif YM. 2001. Detection and persistence of infectious bursal disease virus in specific-pathogen-free and commercial broiler chickens. *Avian Dis* 45:646–654. <https://doi.org/10.2307/1592906>.
- Elankumaran RA, Heckert A, Moura L. 2002. Pathogenesis and tissue distribution of a variant strain of infectious bursal disease virus in commercial broiler. *Avian Dis* 46:169–176. [https://doi.org/10.1637/0005-2086\(2002\)046\[0169:PATDOA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2002)046[0169:PATDOA]2.0.CO;2).
- Abdul R, Murgia MV, Rodríguez-Palacios A, Lee C-W, Saif YM. 2013. Persistence and tissue distribution of infectious bursal disease virus in experimentally infected SPF and commercial broiler chickens. *Avian Dis* 57:759–766. <https://doi.org/10.1637/10448-110812-Reg.1>.
- Ingrao F, Rauw F, Lambrecht B, van den Berg T. 2013. Infectious bursal disease: a complex host-pathogen interaction. *Dev Comp Immunol* 41:429–438. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.03.017>.
- Delgui L, González D, Rodríguez JF. 2009. Infectious bursal disease virus persistently infects bursal B-lymphoid DT40 cells. *J Gen Virol* 90:1148–1152. <https://doi.org/10.1099/vir.0.008870-0>.
- Baba TW, Giroir BP, Humphries EH. 1985. Cell lines derived from avian lymphomas exhibit two distinct phenotypes. *Virology* 144:139–151. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(85\)90312-5](https://doi.org/10.1016/0042-6822(85)90312-5).
- Cubas-Gaona LL, Diaz-Beneitez E, Ciscar M, Rodríguez JF, Rodríguez D. 2018. Exacerbated apoptosis of cells infected with infectious bursal disease virus upon exposure to interferon alpha. *J Virol* 92:e00364-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00364-18>.
- Aaronson DS, Horvath CM. 2002. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* 296:1653–1655. <https://doi.org/10.1126/science.1071545>.
- Santhakumar D, Rubbenstroth D, Martinez-Sobrido L, Munir M. 2017. Avian interferons and their antiviral effectors. *Front Immunol* 8:49. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00049>.
- Reboul J, Gardiner K, Monneron D, Uzé G, Lutfalla G. 1999. Comparative genomic analysis of the interferon/interleukin-10 receptor gene cluster. *Genome Res* 9:242–250.
- Piebler J, Thomas C, Garcia KC, Schreiber G. 2012. Structural and dynamic determinants of type I interferon receptor assembly and their functional interpretation. *Immunol Rev* 250:317–334. <https://doi.org/10.1111/immr.12001>.
- Zhao W, Lee C, Piganis R, Plumlee C, de Weerd N, Hertzog PJ, Schindler C. 2008. A conserved IFN-alpha receptor tyrosine motif directs the biological response to type I IFNs. *J Immunol* 180:5483–5489. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5483>.
- Urin V, Shemesh M, Schreiber G. 2019. CRISPR/Cas9-based knockout strategy elucidates components essential for type 1 interferon signaling in human HeLa cells. *J Mol Biol* 431:3324–3338. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.06.007>.
- O'Brien MA, Moravec RA, Riss TL. 2001. Poly(ADP-ribose) polymerase cleavage monitored in situ in apoptotic cells. *Biotechniques* 30:886–891. <https://doi.org/10.2144/01304pf01>.
- Kane M, Golovkina T. 2010. Common threads in persistent viral infections. *J Virol* 84:4116–4123. <https://doi.org/10.1128/JVI.01905-09>.
- Martín Hernández AM, Carrillo EC, Sevilla N, Domingo E. 1994. Rapid cell variation can determine the establishment of a persistent viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3705–3709. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.9.3705>.
- Grundhoff A, Sullivan CS. 2011. Virus-encoded microRNAs. *Virology* 411:325–343. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.01.002>.
- Manzoni TB, López CB. 2018. Defective (interfering) viral genomes re-explored: impact on antiviral immunity and virus persistence. *Future Virol* 13:493–503. <https://doi.org/10.2217/fvl-2018-0021>.
- Valdovinos MR, Gómez B. 2003. Establishment of respiratory syncytial virus persistence in cell lines: association with defective interfering particles. *Intervirology* 46:190–198. <https://doi.org/10.1159/000071461>.
- Stetson DB, Medzhitov R. 2006. Type I interferons in host defense. *Immunity* 25:373–381. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.08.007>.
- Burkhardt E, Muller H. 1987. Susceptibility of chicken blood lymphoblasts and monocytes to infectious bursal disease virus (IBDV). *Arch Virol* 94:297–303. <https://doi.org/10.1007/BF01310722>.
- Inoue M, Yamamoto H, Matuo K, Hihara H. 1992. Susceptibility of chicken monocyctic cell lines to infectious bursal disease virus. *J Vet Med Sci* 54:575–577. <https://doi.org/10.1292/jvms.54.575>.
- Subissi L, Keita M, Mesfin S, Rezza G, Diallo B, Van Gucht S, Musa EO, Yoti Z, Keita S, Djingarey MH, Diallo AB, Fall IS. 2018. Ebola virus transmission caused by persistently infected survivors of the 2014–2016 outbreak in West Africa. *J Infect Dis* 218:S287–S291. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy280>.
- Ostertag D, Hoblitzell-Ostertag TM, Perrault J. 2007. Overproduction of double-stranded RNA in vesicular stomatitis virus-infected cells activates a constitutive cell-type-specific antiviral response. *J Virol* 81:503–513. <https://doi.org/10.1128/JVI.01218-06>.

32. Méndez F, de Garay T, Rodríguez D, Rodríguez JF. 2015. Infectious bursal disease virus VP5 polypeptide: a phosphoinositide-binding protein required for efficient cell-to-cell virus dissemination. *PLoS One* 10: e0123470. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123470>.
33. Albar JP, Fernández-Arias A, Martínez S, Rodríguez JF, Risco C. 1998. Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *J Gen Virol* 79:1047–1054. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-5-1047>.
34. Soubies SM, Courtillon C, Briand FX, Queguiner-Leroux M, Courtois D, Amelot M, Grousseau K, Morillon P, Herin JB, Etteradossi N. 2017. Identification of a European interserotypic reassortant strain of infectious bursal disease virus. *Avian Pathol* 46:19–27. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1200010>.
35. Li H, Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25:1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>.
36. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25:2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>.
37. Wang K, Li M, Hakonarson H. 2010. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* 38:e164. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq603>.