



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE PREGRADO

“Efecto de la infección del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) en la traducción de los mRNAs de su célula hospedero CHSE/F”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

FERNANDA AYESHA BELÉN CÁRCAMO CÁRCAMO

Director del Seminario de Título:
Dra. Andrea Rivas Aravena

Co - Director del Seminario de Título:
Dr. (c) Sebastián González Catrilelbún

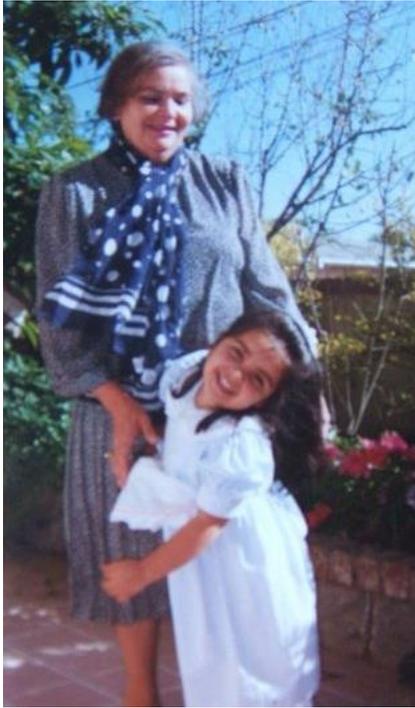
Profesor Patrocinante Seminario de Título:
Dr. Elías Utreras Puratich

Julio 2018
Santiago - Chile

“Lo primero sobre el empoderamiento es comprender que tienes derecho a participar. Lo segundo es que tienes algo importante para contribuir. Y la tercera pieza es que debes correr el riesgo de contribuir”

Mae Jemison, primera mujer astronauta afroamericana en viajar al espacio.

II. BIOGRAFÍA



Fernanda nació el 15 de octubre de 1992, en un lluvioso Quilpué, V región. Hija y nieta única, vivió con su familia en la ciudad del sol hasta los 3 años, cuando se mudaron por razones laborales a la ciudad de Iquique para volver a finales de 1998.

Estudió en un colegio de la comuna de Quilpué, en donde se le incentivó a aprender, explorar, entender el mundo que nos rodea. Destacó en distintas actividades, tales como teatro, baile, artes y ciencias, participando incluso de un Congreso Nacional para jóvenes científicos de Explora CONICYT en 2004.

En segundo medio logró convencer a su familia de participar en un intercambio estudiantil, por lo que el 29 de enero de 2009 partió rumbo a Francia, al pequeño pueblo de Annonay. Allí vivió con una familia anfitriona, con quienes aprendió de la cultura francesa y recorrió los lugares escondidos del país. Durante ese semestre asistió al colegio, aprendió el idioma, participó de muchas actividades e hizo lazos de amistad

para toda la vida. Desde entonces es voluntaria de la organización por la que viajó.

Al volver de su intercambio terminó la enseñanza media en el Colegio Esperanza, hizo nuevos amigos y decidió que estudiar.

En 2011 entró a estudiar a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, por lo que tuvo que cambiar de ciudad. Pasó por distintos cursos, unos más frustrantes que otros, hizo pasantías y unidades de investigación en el Laboratorio de Genética Humana y en el ISP, aprendió, viajó entre dos ciudades, rió y lloró.

En 2014 viajó como voluntaria al Congreso Mundial de AFS en pleno semestre, y desde entonces no dejó de equilibrar vida familiar, universidad, trabajo de laboratorio, voluntariado y viajes.

En 2015 presentó en ICMSS y en las Jornadas Científicas del Instituto de Salud Pública. Ese mismo año decidió dejar de vivir en Santiago y comenzó a viajar a la Universidad desde su hogar en Quilpué, lo que significó muchos kms recorridos, horas de tacs, buses en pana y sueño constante.

En 2016 viajó a Portland, Estados Unidos a aprender de liderazgo intercultural en Reed College y fue invitada a formar parte del Directorio de la fundación Programas Interculturales AFS. A finales de Julio comenzó una Unidad de investigación en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Comisión Chilena de Energía Nuclear, donde continuó su trabajo de seminario de título, hasta finales de noviembre de 2017.

Fue becada por la Embajada de Francia para participar en el Encuentro de Jóvenes

Talentos Científicos de Universcience en 2017 y formó parte de la primera generación de Jóvenes por la Ciencia, Tecnología e Innovación, iniciativa de la Comisión de Ciencia y Tecnología del Congreso Nacional, en conjunto con Congreso Futuro. Además, fue tutora científica de un proyecto Explora, voluntaria de PAR Explora CONICYT Valparaíso y Congreso Futuro 2018, todas experiencias que le han permitido conocer a destacados educadores y científicos reconocidos.

Amante de la cultura, los museos, el arte y el baile, se atrevió a audicionar y participar del Festival Internacional Santiago a Mil 2018, en el espectáculo “Le Grand Continental”, de Sylvain Émard.

A sus 25 años Fernanda se ha dado el gusto de aprender, viajar, conocer, disfrutar y vivir experiencias nuevas; compartir con sus seres queridos, regalinear con su mamá y abuela, acompañar a sus amigos y cuidar a sus mascotas.

III. DEDICATORIA

A mi madre quien me ha amado cada segundo de vida,
en las buenas, las malas, las locuras y las aventuras;
quien ha cuidado de mí, me ha desafiado a ser mejor y ha sido un ejemplo del bien.

A mi abuela, quien siempre ha estado orgullosa de mí,
me ha enseñado a amar a la naturaleza y los seres vivos,
y quien aún con los dolores de su enfermedad me apoya cada día más.

A mi Godi, mis ojitos de uva, por elegir acompañarme y amarme cuando ni yo misma lo
hacía, por ser mi compañía cuando estaba sola y muy perdida, por las largas noches
de estudio y cada miau con el que alegraste mis días mientras nos acompañaste.

A mis ángeles en el cielo, que, aunque ya no están,
han sido y seguirán siendo inspiración,
a quienes siempre he sentido a mi lado,
guiando mis pasos como estrellas en el cielo.

Y cada una de mis mascotas, por enseñarme del amor incondicional.

IV. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi mamá y mi abuela, quienes han sido siempre mis fans, mi apoyo, mis modelos a seguir; sin ellas seguramente no sería ni la mitad de la persona que soy hoy en día. Me han apoyado en cada locura, aventura y proyecto que se me ha ocurrido en esta vida. Gracias, gracias, gracias por todo, por acompañarme en cada sueño, en cada viaje, en cada aventura. Gracias por todo lo que ha sido y las miles de experiencias que aún nos quedan por vivir. Gracias a mi Godi, mi compañera de estudio, compañera de travesuras y compañera de amor gatuno, por cada uno de los días que tu existencia me alegró la vida.

Muchas gracias la tía Gaby y la Tía Pao, por recibirme en sus casas en Santiago, por acompañarme en las largas noches de estudio, los te's compartidos y regaloneos.

Gracias a los Cárcamo y Vega que ya no están, por inspirarme, por preguntar por mí y mantenerme en sus oraciones cuando aún caminaban a mi lado.

También quisiera agradecer a mis amigas y amigos, quienes me han acompañado, soportado y animado durante distintos momentos de la vida, y sobre todo durante la época universitaria. Camila, Eve y Arianne miles de gracias por adoptarme en el colegio y seguir construyendo la linda amistad de hoy, por apoyarme y alegrar mis ratos en Quilpué. A mi amiga con punto Amy, quien me acogió infinitas noches en su departamento, fue compañera de estudio, baile, canto y locuras, gracias por tratarme como un miembro más de tu familia.

A mis amigos y compañeros de la Universidad, por las tardes de estudio – no estudio,

los trabajos en equipo, los ratos libres, tardes de juegos, juegos de cartas, apuntes y risas; hicieron de esos momentos un tesoro valioso que hoy hasta extraño un poco. Mención especial para la Cony y nuestros almuerzos felices; la Vale y su pasado Biotec, el Jero y su humor negro; la Jose y sus consejos; la Carla y su apoyo; el Ariel con su super disposición, Juan Pablo con su buena onda y al mejor grupo – proyecto de la vida: Pame, Carla y Bianqui.

Al Dr. Patricio González del Laboratorio de Genética Humana del ICBM de la Universidad, quien en primer año nos recibió con Cony y nos dio la oportunidad de tener nuestro primer acercamiento con los PCR y el trabajo de Laboratorio; y quién además me permitió volver a aprender y contribuir con su investigación. Gracias también al equipo del Laboratorio de GH, especialmente a Lore, Naty y Pao.

A la tía Vivi, bioquímica del equipo de la sección de Microbiología de Alimentos del Instituto de Salud Pública de Chile, quien producto del gran cariño que le tiene a mi familia, me abrió las puertas al laboratorio de Análisis Molecular, experiencia en la que pude aprender de microbiología, virología y salud pública; además de compartir lo bello de la amistad que perdura con los años y el vínculo de la interculturalidad de AFS.

De ambos tengo el ejemplo de la labor del científico, el rol de la ciencia en la vida diaria y el profesionalismo.

De las experiencias vividas en la universidad, debo mencionar al Programa LEA del Departamento de Pregrado, quienes me dieron la oportunidad de aprender de comunicación y compartir algo que me fascina, enseñar y comunicar. Gracias a Fer por

todas las herramientas, comprensión, ayuda y buena onda. Gracias por soportar mis horarios de tesista y gracias al equipo por permitirme crecer y conocer gente genial como Cristián, Cata, Dany, Dani y tanto otros tutores.

Gracias también a Mirta, compañera de laboratorio y amiga, que hizo de días difíciles y tediosos, algo más agradable, y con quién compartí el periodo de realización de este trabajo. ¡Somos sobrevivientes!

Infinita gratitud a todos aquellos que me han acompañado en este largo y muchas veces frustrante periodo, han iluminado mis días, yo espero haber yo contribuido en los suyos.

Finalmente, me gustaría terminar con los agradecimientos formales, a la Dra. Andrea Rivas y el Dr.(c) Sebastián González, codirectores de este seminario de título; y al Dr. Elías Utreras, profesor patrocinante de la facultad de Ciencias. Al financiamiento de CONICYT a través del proyecto FONDECYT 1150901, sin el que no hubiera sido posible realizar los experimentos aquí detallados, y a la Comisión Chilena de Energía Nuclear, por permitirme entrar en sus dependencias y apoyar este trabajo de investigación.

V.- ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA	iii
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	xv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xviii
INTRODUCCIÓN	1
1.- Salmonicultura en Chile	1
2.- El Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa	2
3.- Traducción de mRNAs	4
• 3.1 Traducción CAP dependiente	5
• 3.2 Traducción IRES dependiente	6
4.- Efecto de la Infección Viral en la Traducción Celular	8
HIPÓTESIS	12
OBJETIVOS	12
• Objetivo General	
• Objetivos Específicos	
MATERIALES Y MÉTODOS	13
1.- Clonamiento de las proteínas virales pVP2 y VP2.	13
• 1.1.- Análisis bioinformático y diseño de primers	13

• 1.2.- Plásmidos	14
• 1.3.- Clonamiento	16
• 1.4.- Subclonamiento	18
2.- Transcripción <i>In Vitro</i>	19
• 2.1.- Transcripción <i>in vitro</i>	19
3.- Línea celular, cepa viral y condiciones de cultivo e infección.	19
• 3.1.- Cultivo Celular	19
• 3.2.- Virus	20
4.- Transfección de Células CHSE/F, Inmunofluorescencia y ensayo Dual Luc	20
• 4.1.- Transfección de Células CHSE/F	20
• 4.2.- Anticuerpos	21
• 4.3.- Inmunofluorescencia	22
• 4.4.- Ensayo Dual Luciferasa	22
• 4.5.- Medición de Fluorescencia	23
• 4.6.- Análisis estadístico de datos y gráficos	23
RESULTADOS	24
1.- Efecto de la infección viral en la traducción de proteínas celulares CAP e IRES dependientes.	24
2.- Efecto de las proteínas virales VP1, pVP2, VP2 y VP4 de IPNV en la traducción de RNAs celulares CAP e IRES dependientes por transfección en células.	26
• 2.1.- Clonamiento de las proteínas virales pVP2 y VP2	26
• 2.2.- Transfección de los plasmidios que codifican para las proteínas virales	32

- 2.3.- Evaluación del efecto de las proteínas virales VP1, pVP2, VP2 y VP4 de IPNV en la traducción CAP e IRES dependientes por transfección en células. **34**

DISCUSIÓN	37
CONCLUSION	41
BIBLIOGRAFÍA	43

VI.- ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Primers diseñados para amplificación del gen codificante de las proteínas virales de IPNV pVP2 y VP2	14
Tabla 2.- Plasmidios	15
Tabla 3.- Programa utilizado para la amplificación de los fragmentos codificantes de las proteínas virales de IPNV pVP2 y VP2.	17
Tabla 4.- Anticuerpos y marcadores fluorescentes utilizados para inmunofluorescencia	21

VII.- ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Efecto de la infección de IPNV sobre la traducción de proteínas celulares	9
Figura 2.- Esquema de los RNA de reporteros bicistrónicos.	24
Figura 3.- Efecto de la infección de IPNV sobre la traducción CAP e IRES dependiente en células CHSE/F.	26
Figura 4.- Esquema de la metodología utilizada para el clonamiento de pVP2 y VP2.	27
Figura 5.- PCR de Colonias para pGEM-T ligado a fragmento de pVP2 o VP2.	28
Figura 6.- PCR de Colonias para pcDNA3.1 ligado al fragmento codificante de VP2.	30
Figura 7.- Verificación de los plasmidios pCDNA3.1-pVP2 y pCDNA3.1-VP2 con corte con enzima <i>Xho I</i>	31
Figura 8.- Inmunofluorescencia de células CHSE/F transfectadas con proteínas virales VP1, VP2 y VP4.	33
Figura 9.- Efecto de las proteínas virales de IPNV VP1, pVP2, VP2 y VP4 sobre la traducción CAP e IRES dependiente en células CHSE/F.	36

VIII.- Índice de Abreviaturas

ATP	Adenosín trifosfato
GTP	Guanisín trifosfato
Met-tRNA_i	Anticodón de inicio de la traducción
CMV	Citomegalovirus
CrPV	Virus de la parálisis de cricket
DI	Dual Luc
eIF	Factores eucarióticos de Inicio de la traducción
EMCV	Virus de Encefalomiocarditis
GDP	Guanosín difosfato
gRNA	RNA genómico
HAV	Virus de la Hepatitis A
HCV	Virus de la Hepatitis C
HIV	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
Hpi	Horas post infección
HRV	Rinovirus
iAUG	Codón AUG de inicio
IPN	Necrosis Pancreática Infecciosa
IPNV	Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa
IRES	Sitio de Entrada al ribosoma
ITAF	Factores proteicos trans-activadores de IRES
LB	Lysogeny Broth
MEM	Medio Esencial Mínimo
MOI	Multiplicidad de Infección
mRNA	RNA mensajero
Nt	Nucleótido
ORF	Marco abierto de lectura
PABP	Proteína de Unión a poli(A)
PCBP2	Proteína de unión de poli (rC) 2
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PERK	Proteína quinasa del retículo endoplasmático
PTB	Proteína De unión al tracto de polipirimidina
PV	Poliovirus
pVP2	Precursora de VP2
RNA	Ácido Ribonucleico
SFB	Suero fetal bovino
UTR	Región no traducida
VP	Proteína Viral
Vpg	Proteína viral unida al genoma

RESUMEN

En nuestro país, la necrosis pancreática infecciosa (IPN) es una enfermedad endémica, prevalente y de importancia económica, ya que está ampliamente distribuida en las salmoniculturas chilenas. El virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) pertenece a la familia *Birnaviridae*, género *Aquabirnavirus*. Se caracteriza por no tener envoltura lipídica y un diámetro cercano a los 60 nm. Su genoma está compuesto por dos segmentos de RNA de doble hebra, segmento A y B. Los extremos 5' de cada segmento tienen unida covalentemente la proteína viral Vpg de 94 kDa. El RNA mensajero (mRNA) no posee cola de poliadenina o CAP. Se ha demostrado que la infección viral inhibe la síntesis de proteínas celulares a la vez que los polipéptidos virales comienzan a ser detectados, por ello se espera que el mecanismo de inicio de la traducción viral sea diferente al de la célula huésped. Si bien se han realizado estudios que buscan entender dicho fenómeno, no se ha descrito qué proteína viral podría ser la responsable de éste. Basado en estos antecedentes, en este seminario de título se buscó evaluar el efecto de la infección viral y la contribución particular de las proteínas virales VP1, pVP2, VP2 y VP4 en la traducción de los mRNAs reporteros cuya traducción fuera dependiente de CAP o del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). Para ello se evaluó la expresión de reporteros bicistrónicos (dual luc o dL) que contienen los IRES del virus de la parálisis de Cricket (CrPV) y del virus de la hepatitis C (HCV). Se utilizó la línea celular derivada de células embrionarias de *Lepomis macrochirus*, CHSE/F, las cuales son susceptibles a la infección de IPNV. Las células fueron infectadas o transfectadas con plasmidios codificantes de las proteínas virales. Para los experimentos de transfección se utilizaron plasmidios codificantes para VP1 y VP4 con los que ya se contaba en el laboratorio y se generaron, por clonamiento bacteriano, plasmidios codificantes de la proteína estructural VP2 y su precursora pVP2. Estos vectores bacterianos fueron evaluados mediante PCR

e inmunofluorescencia.

En el experimento de infección de células CHSE/F se observó una disminución de la traducción CAP dependiente y un aumento de la traducción IRES dependiente.

Por otra parte, en el experimento de transfección se registró que VP1 y VP4 inhiben la traducción CAP dependiente y estimulan la traducción IRES dependiente. En el caso de los ensayos realizados con VP2 y pVP2, en presencia de la proteína estructural precursora la traducción CAP dependiente disminuyó a la mitad, mientras que al transfectar VP2 no hubo cambios significativos. Los resultados respecto a la traducción IRES dependiente, en presencia de las proteínas estructurales son poco claros - con pVP2 no se reportaron cambios significativos, y con VP2 la traducción aumentó para 1 de los reporteros (dICrPV), mientras que disminuyó para el otro (dIHCV). Estos resultados muestran que las proteínas virales afectan de distinta manera la traducción de los mRNAs, lo que sugiere que son estas las responsables de la inhibición de la traducción CAP dependiente y de la estimulación de la traducción IRES dependiente.

ABSTRACT

In our country, infectious pancreatic necrosis (IPN) is an endemic, prevalent and economically important disease that is widely distributed in Chilean salmon farms. The infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) belongs to the family Birnaviridae, genus Aquabirnavirus. It is characterized by having no lipid envelope and a diameter close to 60 nm. Its genome is composed of two segments of double-stranded RNA, segment A and B. The 5' ends of each segment is covalently linked to the viral protein Vpg of 94 kDa. The messenger RNA (mRNA) does not have a polyadenine tail or CAP. It has been shown that viral infection inhibits the synthesis of cellular proteins at the same time that viral polypeptides begin to be detected, therefore it is expected that the mechanism of viral translation initiation will be different from that of the host cell. Although there have been studies that seek to understand this phenomenon, it has not been described what viral protein could be responsible for it. Based on this background, this title seminar aimed to evaluate the effect of viral infection and the particular contribution of viral proteins VP1, pVP2, VP2 and VP4 in the translation of reporter mRNAs whose translation was dependent on CAP or the internal ribosome entry site (IRES). To this end, the expression of bicistronic reporters (dual luc or dL) containing the IRES of the Cricket palsy virus (CrPV) and the hepatitis C virus (HCV) was evaluated. The cell line derived from *Lepomis macrochirus* embryonic cells, CHSE / F, which is susceptible to IPNV infection was used. The cells were infected or transfected with plasmids coding for the viral proteins. For the transfection experiments, plasmids coding for VP1 and VP4 that were used were those already counted in the laboratory and plasmids coding for the structural protein VP2 and its pVP2 precursor was generated by bacterial cloning. These bacterial vectors were evaluated by PCR and immunofluorescence.

In the CHSE / F cell infection experiment, a decrease in CAP-dependent translation and

an increase in IRES-dependent translation was observed.

On the other hand, with the transfection experiment it was recorded that VP1 and VP4 inhibit the CAP-dependent translation and stimulate the IRES-dependent translation. In the case of the tests carried out with VP2 and pVP2, in the presence of the precursor structural protein, the CAP dependent translation decreased by half, whereas when transfecting VP2 there were no significant changes. The results regarding IRES dependent translation, in the presence of structural proteins are unclear. With pVP2 no significant changes were reported, and with VP2 the translation increased for 1 of the reporters (dICrPV), while it decreased for the other (dIHCV). These results show that viral proteins affect the translation of mRNAs in different ways, suggesting that they are responsible for the inhibition of CAP dependent translation and the stimulation of IRES-dependent translation.

INTRODUCCION

1.- Salmonicultura en Chile

La acuicultura comercial se comenzó a desarrollar en la década de los 80's cuando se incentivó, como política económica, la actividad privada y la apertura al comercio internacional, privilegiando el cultivo de especies introducidas de alto valor comercial (Fuente: Food and Agriculture Organization).

Particularmente, los cultivos de salmónidos son los que han tenido una permanente mejora, debido principalmente al mayor desarrollo tecnológico desde sus inicios. La adaptación de tecnologías de cultivo extranjeras, importación masiva de alevines y ovas, inversión en proyectos de investigación para mejorar las condiciones de cultivo y reproducción de los especímenes, entre otros (Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología; 2007), han posicionado a la salmonicultura como el segundo sector exportador del país, después de la minería; y ha posicionado a Chile con un tercio del mercado mundial del Salmón, superado sólo por Noruega (Fuente: SalmonChile, Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura, Servicio Nacional de Aduanas).

El cultivo del Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), representó 73,13% de la producción nacional de salmónidos en 2016, mientras que el Salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y la Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) representan el 26,87%, alcanzando una producción total de 727.812 toneladas. Esto ha generado ganancias de cerca de 4000 millones de dólares FOB que corresponden al 6,44% del total de los ingresos percibidos por el país por concepto de exportaciones (Fuente: Servicio Nacional de Aduanas).

Es importante mencionar que la industria salmonera puede verse afectada por distintas

amenazas, entre ellas las enfermedades infecciosas, que son la primera causa de pérdidas para la industria (Fuente: SalmonChile; Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura).

Dentro de las enfermedades infecciosas, la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) causada por el Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) es una enfermedad frecuente en los cultivos de salmónidos del país. En 2015 y 2016 fue detectada en las tres especies cultivadas en el país, alcanzando hasta un 31,2% de los casos detectados para el salmón coho en el periodo 2016 (Fuente: Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura; 2014 – 2016). A pesar de que se han generado diversas vacunas contra esta enfermedad, IPNV se mantiene como la primera causa de muerte por infecciones virales, según lo reportado por el programa de vigilancia pasivo de los centros productivos (Fuente: Servicio Nacional de Pesca y Agricultura; 2014 – 2016).

2.- El Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa

IPNV es miembro de la familia *Birnaviridae*, género *Aquabirnavirus*. El virus fue aislado por primera vez en 1957 en Estados Unidos, y a la fecha ha sido clasificado en dos grupos: grupo A, con 9 serotipos; y grupo B, con sólo 1 serotipo (Hill B. & Way K.; 1995).

Los peces infectados, presentan lesiones en el tejido pancreático, exoftalmia, oscurecimiento de la piel, hígado pálido, hemorragias en los ciegos pilóricos y/o grasa visceral (Santi N. & cols; 2005; Roberts R. & Pearson M.; 2005). Particularmente en *Oncorhynchus mykiss*, se ha detectado el virus en leucocitos de riñón y bazo 2 días después de la inoculación, con un máximo entre el día 7 y 8, y permaneciendo hasta 21 días después de la infección (Tate H. & cols; 1990). También han sido descritas infecciones persistentes en *Salmo salar L*, es decir, los peces sobreviven, pero siguen

produciendo partículas virales (Julin K. & cols; 2014).

IPNV es capaz de replicar en líneas celulares derivadas de una amplia gama de hospederos de agua dulce y salada (Orpetveit I. & cols; 2012), entre ellas la línea celular CHSE-214, actualmente CHSE/F, derivada de células embrionarias de *Lepomis macrochirus* (Fryer & cols, 1965).

El ciclo viral comienza con la entrada del virus a la célula mediado por un receptor no identificado, tras lo cual se encuentra en compartimientos vesiculares en el citoplasma (Somogyi P. & Dobos P.; 1980). También se ha descrito, recientemente, la entrada del virus por macropinocitosis a células CHSE-214 (Levicán J. & cols.; 2017). Entre las 4 y 6 horas post-infección (hpi) pueden ser identificados los mRNAs virales 24S. Dichos RNA son traducidos, detectándose los primeros polipéptidos virales alrededor de las 6 hpi, Entre las 8 y 10 hpi se alcanza el máximo de síntesis de RNA viral genómico, proceso que decae entre las 14 a 16 hpi (Somogyi P. & Dobos P.; 1980). Las partículas virales infectivas pueden ser detectadas en el sobrenadante de cultivo aproximadamente a las 24 hpi (Dobos P.; 1996. Malsberger R.G. & Cerini C.P.; 1965). El ciclo replicativo finaliza luego de 24 horas, cuando es posible reconocer efecto citopático característico en cultivos infectados (Somogyi P. & Dobos P.; 1980).

IPNV presenta un diámetro aproximado de 70 nm y se caracteriza por no tener recubrimiento lipídico. Su genoma está compuesto por dos segmentos de RNA de doble hebra, denominados segmento A y B que no poseen CAP ni cola de poliadenina. El extremo 5' de cada hebra de cada segmento genómico posee unida covalentemente la proteína viral Vpg de 94 kDa (Calvert J. G. & cols; 1991). El segmento A tiene dos marcos de lectura (ORF) denominados ORF L y ORF S (L de Large, grande en inglés. S de small, pequeño en inglés). El ORF L codifica para una poliproteína, de 106 kDa,

la cual es proteolizada co-traduccionalmente por la proteasa del virus, VP4, para generar la precursora de proteína de la cápside pVP2 y la proteína de matriz VP3 y a VP4. Posteriormente pVP2 será proteolizada en la región C- terminal, generando VP2 madura, de 442 aminoácidos (Galloux M. & cols, 2004). El ORF S se sobrelapa en el extremo 5' de la región codificante de la poliproteína, y codifica para VP5 de 17 kDa, cuya función no ha sido totalmente caracterizada, pero se propone que tiene una actividad antiapoptótica (Santi N. & cols; 2005).

Por su parte el fragmento B codifica para VP1, la RNA polimerasa dependiente de RNA. VP1 también puede encontrarse unida a cada extremo 5' de cada hebra de RNA, denominándose Vpg, por viral protein genome (Calvert J. G. & cols; 1991). La unión de VP1 al RNA como Vpg ocurre porque esta proteína también actúa como partidor de la síntesis de RNAs virales. Para esto, Vpg se autoguanila dos veces en un residuo de serina, lo que le permite alinearse con 2 citidinas ubicadas en el extremo 3' del RNA templado. El extremo 3'OH libre es extendido por VP1 libre, generando la hebra complementaria unida covalentemente a Vpg (Dobos P.; 1993).

Respecto a la traducción de los mRNAs virales, se sabe que depende de la maquinaria traduccional de la célula huésped, ya que IPNV, al igual que todos los virus descritos a la fecha, carece de maquinaria traduccional propia.

3.- Traducción de mRNAs

La iniciación de la traducción es la etapa que comienza con el reclutamiento de la maquinaria traduccional en el mRNA y culmina con el posicionamiento del Met- tRNA_i,

en el sitio P del ribosoma colocado en el codón de inicio AUG (iAUG). Esta es la etapa más finamente regulada del proceso de síntesis de proteínas (Hershey J. & Merrick W.; 2000).

Se han descrito al menos dos mecanismos mayormente representados, de inicio de la traducción: el mecanismo CAP-dependiente canónico y el IRES-dependiente.

3.1 Traducción CAP dependiente

En el mecanismo CAP dependiente, también conocida como traducción canónica, una guanina modificada por metilación en la posición 7 (7mGpppN), conocida como CAP y unida mediante un enlace trifosfato 5'-5' al extremo 5' del mRNA (Shatkin A. J.; 1976), es reconocida por el complejo de factores de inicio eucariótico de la traducción (eIF) eIF4F.

El complejo eIF4F está constituido por eIF4E, la proteína del unión al CAP (Matsuo H. & cols; 1997); eIF4A, una RNA helicasa ATP dependiente que desenrolla la estructura secundaria del mRNA para permitir el acceso de las subunidades ribosomales (Rogers G.W. Jr. & cols; 1999); y la proteína de andamiaje, eIF4G, que media las interacciones proteína – proteína para facilitar la unión del mRNA al complejo de preiniciación 43S (Hentze M.W.; 1997).

El inicio de la traducción comienza por el reconocimiento de la estructura CAP por eIF4E, posteriormente la subunidad 40S ribosomal unida al complejo ternario, conformado por eIF2-GTP/Met-tRNAⁱ; eIF1A y eIF3 es reclutada al mRNA por interacción de eIF3 con eIF4G. eIF4G interactúa con la proteína de unión a poli (A) (PABP), causando la circularización del mRNA por unión de los extremos 5'y 3' (Tarun S.Z. Jr. & Sachs A.B.; 1996. Imataka H. & cols; 1998. Kahvejian A. & cols; 2001). También son reclutadas eIF1 y eIF5, eIFs que contribuyen en el reconocimiento del

codón iAUG. Entonces el complejo de iniciación migra en dirección 5' a 3', realizando un scanning de la región 5'UTR, promovido por eIF4A, hasta encontrar el iAUG (Hershey J. & Merrick W; 2000), que normalmente está en un contexto conservado para el inicio de la traducción, AccAUGG, denominado contexto Kozak (Kozak M.; 1986). La unión codón/anticodón entre el iAUG y Met-tRNA_i produce la hidrólisis del GTP unido a eIF2, factor que pasará de estado activo, fosforilado, a inactivo, no fosforilado; mediado por eIF5, una proteína GTPasa (Das S. & Maitra U.; 2001). La hidrólisis del GTP unido a eIF5B, permite la unión de la subunidad 60S con la 40S, dando paso al proceso de elongación del péptido (Lee J.H. & cols; 2002. Pestova T.V. & cols: 1998).

3.2 Traducción IRES dependiente

En el mecanismo IRES-dependiente, la maquinaria de inicio de la traducción es reclutada en la región 5'UTR del RNA, próximo al iAUG, en independencia del CAP (Komar A. & Hatzoglou M; 2005), aunque se han descrito IRES que también abarcan parte de la región codificante (de Breyne S. & cols; 2008. Reineke L.C. & cols; 2009. Liu G. & cols; 2011. Willcocks M.M. & cols; 2011), así como también otros dentro de la región codificante (Bieleski L. & cols; 2001. Nicholson M.G. & cols; 2006. Weill L. & cols; 2006). Este mecanismo fue descrito por primera vez en picornavirus (Pelletier J. & Sonenberg N.; 1988), y depende de que la región 5'UTR adopte una estructura adecuada para conformar IRES, (Komar A. & Hatzoglou M; 2005). Dado que los sitios de entrada al ribosoma (IRES) son capaces de iniciar la síntesis de manera CAP-independiente, tienen requerimientos de eIFs distintos que la traducción CAP-dependiente. La mayoría (el virus de la Hepatitis A (HAV) es la excepción) son independientes del factor que reconoce CAP, eIF4E. También se han descritos algunos que no tienen necesidad de ningún eIF, como el del Virus de parálisis de Cricket (CrPV)

(Pestova T.V. & Hellen C.U.; 2003), el cual adquiere una estructura secundaria que sustituye al Met-tRNAi y que es capaz de reclutar la subunidad 40S y luego la subunidad mayor para iniciar directamente la síntesis de proteínas desde el sitio A del ribosoma (Wilson J.E. & cols; 2000. Jan E. & Sarnow P.; 2002). Otros IRES necesitan de algunos factores de inicio y de Met-tRNAi para el reclutamiento de 40S, como por ejemplo el virus de la Hepatitis C (HCV) cuyo IRES requiere de eIF3, eIF2 y Met-tRNAi (Sizoua D.V. & cols; 1998); y algunos requieren de todos los eIFs, como el IRES de hepatitis A (HAV) (Borman A.M. & Kean K.M; 1997 Borman A.M. & cols; 2001).

Se debe destacar que todos los IRES requieren de proteínas celulares diferentes a los eIFs canónicos, conocidos como factores proteicos trans-activadores de IRES (ITAFs), necesarios para su actividad (Kieft JS.; 2008). Se postula que los ITAFs son necesarios para que la región 5'UTR adquiera la conformación adecuada para reclutar a la maquinaria de inicio de la traducción (Belsham G.J. & Sonenberg N.; 1996. Vagner S. & cols.; 2001). Algunas de ellas son el autoantígeno humano La, ITAF para el IRES de HCV (Ali N. & cols; 2000. Pudi R. & cols; 2003. Costa-Mattioli M & cols; 2004); la proteína de unión de poli (rC) 2 (PCBP2), que ha sido asociada a poliovirus (Blyn L.B. & cols; 1997. Gamarnik A.V. & Andino R.; 1997. Gamarnik A.V. & Andino R.; 2000.); la proteína de unión al tracto de polipirimidina (PTB) (Conte M.R. & cols; 2000), asociada a rinovirus (HRV), al igual que la proteína ITAF₄₅ (Pilipenko E.V. & cols; 2000).

Dado que la característica del mecanismo IRES dependiente es que ocurre de manera CAP independiente, se hizo necesario el desarrollo de herramientas y metodologías que permitieran estudiarlos adecuadamente. En la actualidad la mejor herramienta para detectar IRES son los mRNA bicistrónicos. Éstos codifican para dos proteínas distintas,

el primer cistrón es traducido de manera CAP dependiente y el segundo es traducido siempre y cuando en la región intercistrónica se encuentre un IRES (Revisado en Terenin I.M. & cols; 2016). De esa manera es posible tener un acercamiento respecto al fenómeno de la traducción celular, utilizando un mismo reportero. Dentro de los más utilizados se encuentran los que en el primer cistrón codifican para Renilla Luciferasa y en el segundo para Firefly Luciferasa (Sherf B.A. & cols; 1996).

Recientemente se ha descrito que la región 5' – no codificante (UTR) del segmento A posee un sitio de entrada al ribosoma, que permite la traducción de la poliproteína en condiciones en la que la traducción CAP dependiente esté inhibida (Rivas-Aravena A. & cols.; 2017).

4.- Efecto de la Infección Viral en la Traducción Celular

Se ha descrito que durante la infección viral de IPNV ocurre una inhibición de la síntesis de proteínas celulares (Chen L. & cols, 2013. Gamil & cols; 2015), evento que favorece la traducción de los mRNAs virales, tal como se muestra en la figura 1 (Gamil & cols; 2015. Gamil & cols; 2016).

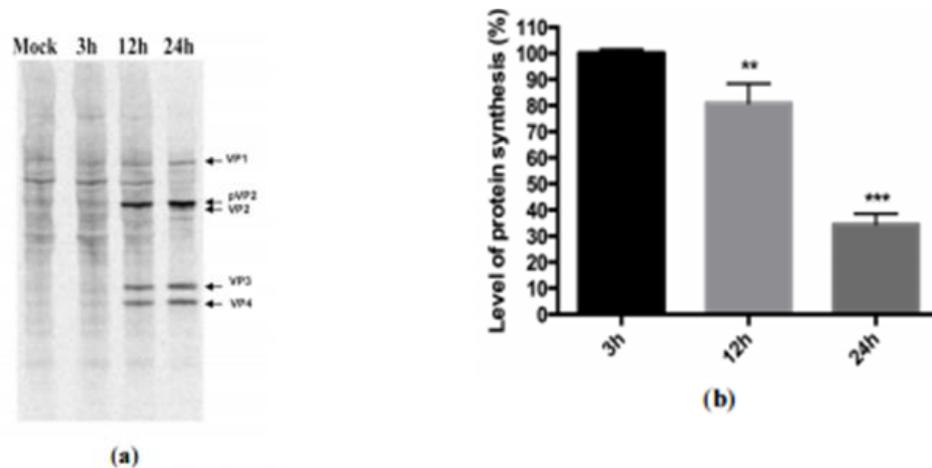


Figura 1.- Efecto de la infección de IPNV sobre la traducción de proteínas celulares. Modificado de figura 2 de Gamil & cols; 2015: El virus de la necrosis pancreática infecciosa indujo la inhibición de la síntesis de proteínas en células CHSE-214. Las células se infectaron, las proteínas sintetizadas se marcaron usando ^{35}S -metionina y se purificaron en los tiempos indicados (3, 12 y 24 horas). (a) Los lisados preparados se analizaron por SDS-PAGE, seguido por autorradiografía usando Typhoon. Los números representan el tiempo en horas después de la infección; (b) Niveles de síntesis de proteína expresados como porcentajes de las células infectadas después de la medición de las cantidades promedio de proteínas de tres bandas diferentes usando el software ImageQuant (GE Healthcare). Los resultados son representativos de cuatro experimentos independientes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Según antecedentes anteriores, la infección viral es responsable de inducir el estrés del retículo endoplasmático, particularmente el RNA doble hebra, el cual serviría de señal para la proteína quinasa del retículo endoplasmático (PERK) (Huang H.L. & cols; 2011). Estas proteínas fosforilan a eIF2 α , previniendo el reciclaje de GDP y con ello impidiendo el inicio de la traducción (Gamil & cols; 2016), lo que no afectaría la traducción de proteínas virales (Garner J.N. & cols; 2003. Gamil & cols; 2016).

Además se ha visto en algunos otros virus que la proteasa viral corta el complejo eIF4F, particularmente a la proteína andamio eIF4G. Este hecho fue primeramente reportado en poliovirus (Etchinson D. & cols; 1982) cuya proteinasa 2V corta a eIF4G1 entre los aminoácidos 681 y 682 de la región N-terminal (Lamphear B.J. & cols; 1993. Sommergruber W. & cols; 1994), dejando al complejo eIF4F en dos partes: el dominio de unión de eIF4G a eIF4E y el dominio de unión de eIF4G a eIF3 (Lamphear B.J. & cols; 1995), impidiendo así la unión del complejo eIF4F al CAP y reclutamiento de la subunidad 40S. Otros virus en los que se ha reportado acción de la proteinasa en la inhibición de la traducción CAP dependiente son el calicivirus felino (Willcocks M.M. & cols; 2004), rinovirus (HRV) (Haghighat & cols; 1996) y HIV – 1, donde la proteinasa viral corta no solo a eIF4G, sino que también a la proteína de unión a poly(A) (PABP) (Castelló A. & cols; 2009), favoreciendo la traducción de los mRNA virales de manera IRES dependiente.

De acuerdo a los antecedentes expuestos, IPNV cuenta con un mRNA no capeado ni poliadenilado unido a VPg, posee un IRES en el segmento A y la infección por IPNV es capaz de inhibir la traducción celular luego de la infección, y no la traducción de los mRNAs virales. Dado que la mayoría de los mRNAs celulares son dependientes de CAP, se espera que la infección viral inhiba la traducción CAP dependiente celular y que los mRAs virales sean traducidos por un mecanismo alternativo IRES dependiente. Para ahondar en el conocimiento de cómo afecta IPNV los inicios de la traducción CAP e IRES dependientes, se analizará el efecto de la infección por IPNV y se determinará que proteínas virales afectan en la traducción de un reportero bicistrónico que contiene los IRES de CrPV y HCV.

El entendimiento de cuáles son las proteínas virales involucradas en la inhibición de la

traducción celular, es relevante para el entendimiento del ciclo replicativo viral. Las bases moleculares de la infección por IPNV han sido muy poco estudiadas y su comprensión es importante en el diseño de futuras soluciones, que le permitan a la industria acuícola prevenir y controlar la enfermedad, para así evitar las pérdidas económicas asociadas.

HIPÓTESIS

La infección de IPNV en células CHSE/F inhibe la traducción CAP dependiente y los mRNAs virales son traducidos por un mecanismo alternativo.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el efecto de la infección del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) en la traducción proteica en su célula hospedero CHSE/F.

Objetivos Específicos

- 1.- Evaluar el efecto de la infección viral en la traducción de proteínas CAP e IRES dependientes.
- 2.- Evaluar el efecto de las proteínas virales VP1, pVP2, VP2 y VP4 de IPNV en la traducción de RNAs CAP e IRES dependientes por transfección en células.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Clonamiento de las proteínas virales pVP2 y VP2.

1.1.- Análisis bioinformático y diseño de primers

Para el clonamiento de las proteínas virales pVP2 y VP2 se diseñaron primers específicos, utilizando como referencia la secuencia de la cepa Jasper de IPNV (NC_001915.1). Para ello se utilizaron las herramientas bioinformáticas en línea Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) y OligoAnalyzer (www.idtdna.com). Además en el diseño de cada oligonucleótido se adicionó una secuencia de reconocimiento para una enzima de restricción que permitiera insertar el producto en el sitio de clonamiento múltiple del vector pcDNA 3.1. En el caso del primer directo la secuencia de reconocimiento elegida es para la enzima *Hind III* y del primer reverso la secuencia para *Eco RV*. Para el caso de los genes de ambas proteínas virales, fue necesario incluir en el diseño de los oligos correspondientes a los primers reversos anticodón de un codón de término a la secuencia, en azul en la tabla 1. La síntesis de los primers fue realizada por *Integrated DNA Technologies* (IDT, San Diego, California, Estados Unidos).

Tabla 1.- Primers diseñados para amplificación del gen codificante de las proteínas virales de IPNV pVP2 y VP2.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Dirección
VP2 F <i>HindIII</i>	<u>CCCAAGCTT</u> ATGAGCACATCCAAGGCAACC	58,2	D
pVP2 R <i>Eco RV</i>	<u>CGGATATCTCA</u> AGCCCATGAGTCCATGACATC	57	R
VP2 R 442-443 <i>Eco RV</i>	<u>CGGATATCTCA</u> TGTCCTTTCTTTGTATTCTCAGTCCTCC	63,3	R

1.2.- Plásmidos

Se utilizó el plásmido pcDNA 3.1 (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) para realizar el subclonamiento de las proteínas virales, ya que cuenta con el promotor CMV, que permite la expresión de proteínas exógenas en células eucariontes. Además se utilizó el sistema pGEM-T Easy Vector (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA) para ligar el gen de las proteínas virales, obtener DNA plasmidial puro en grandes cantidades, y a partir de éste recuperar el fragmento deseado por corte con enzimas de restricción, para ligarlo entonces en pcDNA3.1 linealizado. En la tabla 2 se detalla la información de los plasmidios utilizados y obtenidos en este trabajo.

Tabla 2.- Plasmidios

Nombre	Características
pGEM-T	Vector de clonación en <i>E. coli</i> con sitio de clonamiento múltiple en el cual se inserta el fragmento. Posee gen de lac z y resistencia a la ampicilina.
pGEM-T_VP2	Vector pGEM-t que contiene inserto el gen de VP2, con un codón de término.
pGEM-T_pVP2	Vector pGEM-t que contiene inserto el gen de pVP2, al cual se le agregó un codón de término.
pTriex 3 - VP1	Vector pTriex3 que contiene inserto el gen de VP1 entre los sitios de corte <i>Nco I</i> y <i>Not I</i> del sitio de clonamiento múltiple.
pTriex 3 - VP4	Vector pTriex3 que contiene inserto el gen de VP4, nucleótido 514 a 734 del Segmento A de IPNV Cepa Jasper, entre los sitios <i>Nco I</i> y <i>Xho I</i> del sitio de clonamiento múltiple.
pcDNA3.1	Vector con promotor de citomegalovirus (CMV) para una expresión de alto nivel, sitio de clonamiento múltiple, señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino (BGH) y secuencia de finalización de la transcripción para una mayor estabilidad de Mrna. Origen de replicación episomal SV40 y gen de resistencia a ampicilina. Origen de pUC para la selección y el mantenimiento en <i>E. coli</i> .
pcDNA 3.1 - VP2	Vector pcDNA 3.1 que contiene inserto el gen de VP2 (1290 nt) entre el sitio de corte <i>Hind III</i> y <i>Eco RV</i> del sitio de clonamiento múltiple.

pcDNA 3.1	-	Vector pcDNA 3.1 que contiene inserto el gen de pVP2 (1550 nt) entre el sitio de corte <i>Hind III</i> y <i>Eco RV</i> del sitio de clonamiento múltiple.
pVP2		
pcDNA6.1	-	Vector pcDNA 3.1 que contiene inserto el gen de la proteína fluorescente mCherry
mCherry		
dIΔEMCV		Vector pGL3-Basic Dual Luc con el IRES parcial del virus de la Encefalomiocarditis entre los genes codificantes de Renilla y Firefly Luciferasa.
dICrPV		Vector pGL3-Basic Dual Luc con el IRES del virus de parálisis Cricket entre los genes codificantes de Renilla y Firefly Luciferasa.
dIHCV		Vector pGL3-Basic Dual Luc con el IRES del virus de la Hepatitis C entre los genes codificantes de Renilla y Firefly Luciferasa.
pUC57-		Vector pUC57 con la secuencia del Segmento A de IPNV.
Segmento A		
IPNV		

1.3.- Clonamiento

Se amplificaron los genes de las proteínas virales mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los partidores diseñados, agua libre de nucleasas y 2x MyTaq Red Mix (Bioline, Londres, Inglaterra), según las especificaciones del fabricante. Se utilizó como templado para la amplificación de las proteínas virales pVP2 y VP2 el Segmento Viral A de IPNV, cepa Jasper, clonado en el plasmidio pUC57 (Genescript, Piscataway, Nueva Jersey, Estados Unidos). El programa utilizado para la amplificación de los fragmentos se detalla en la tabla 3, para ambos genes, pVP2 y VP2, se utilizó la

misma temperatura de hibridación.

Tabla 3.- Programa utilizado para la amplificación de los fragmentos codificantes de las proteínas virales de IPNV pVP2 y VP2.

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Denaturación Inicial	95°C	2 minutos	1
Denaturación	95°C	30 segundos	35
Hibridación	58°C	45 segundos	
Extensión	72°C	30 segundos	
Extensión Final	72°C	5 minutos	1

Los productos PCR fueron recuperados desde geles de agarosa 1%, teñidos con Bromuro de Etidio 0,1 mg/mL, con el Kit “E.Z.N.A Gel Extraction Kit” (OMEGA bio-tek, Norcross, Georgia, Estados Unidos), utilizado según las recomendaciones del fabricante.

El material genético obtenido fue entonces cuantificado en el equipo Infinite m200 (TECAN, Männedorf, Suiza) y ligado al vector pGEM-T (Promega), en una proporción fragmento:vector de 3:1, siguiendo las indicaciones del sistema de clonamiento.

Posteriormente se tomó una alícuota de 2 uL la ligación, la cual fue utilizada para transformar 50 uL de células bacterianas quimio - competente por estrés térmico.

Para ello se utilizaron células bacterianas de *E. coli Novablue* competentes con las que se contaba en el laboratorio, éstas fueron incubadas en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml con alícuotas de los plasmidios durante 30 min en hielo, 45 segundos a 42°C y

finalmente 10 min en hielo. Tras eso se les agregó medio Lysogeny Broth (LB) líquido (10 g Triptona, 5 g Extracto de levadura, 10 g NaCl; para 1 L de medio) y se incubaron a 37°C por 1 hora. Los cultivos se centrifugaron a 3500 x g durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en el medio restante, para luego ser depositado en placas de medio semisólido LB-AGAR suplementadas con Ampicilina (1 mg/mL).

Para la selección de las colonias bacterianas se realizó un PCR de colonias, utilizando el programa detallado en la tabla 3, para determinar cuáles contenían el plasmidio con el fragmento deseado incorporado. Una vez determinado que colonias contaban con el fragmento se crecieron en LB/ Ampicilina líquido durante la noche y se extrajo el DNA plasmidial utilizando el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

1.4.- Subclonamiento

Se recuperó el fragmento ligado al plasmido pGEM-T por digestión con enzimas de restricción y posterior electroforesis en gel de agarosa 1%, teñido con Bromuro de Etidio 0,1 mg/mL, tras lo que se extrajo el DNA del gel con el Kit "E.Z.N.A Gel Extraction Kit" (OMEGA bio-tek), utilizado según las recomendaciones del fabricante.

El fragmento fue cuantificado, Infinite m200 (TECAN), y ligado al vector pcDNA 3.1 en una proporción fragmento:vector de 3:1 y 1:1, con la enzima T4 DNA Ligasa (ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), según las indicaciones de la misma.

Se transformaron células bacterianas quimio – competentes por estrés térmico, y se seleccionaron colonias mediante PCR de colonias. Se purificó DNA plasmidial y se verificó presencia del gen por digestión enzimática con *XhoI* (ThermoScientific).

Una vez que se eligió al clon que contenía el gen de proteína viral en la dirección deseada, se creció en medio LB, suplementado con Ampicilina, y se purificó con el Kit PureYield Plasmid Midiprep System (Promega).

Antes de utilizar los plasmidios obtenidos para transfección se cuantificó el material genético.

2.- Transcripción *In Vitro*

2.1.- Transcripción *in vitro*

Utilizando el kit “mMESSAGE mMACHINE® T7 Ultra Kit” (Ambion, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), el cual está diseñado para síntesis *in vitro* de grandes cantidades de RNA capeado y poliadenilado, se transcribieron los reporteros bicistrónicos d Δ EMCV, dICrPV y dIHCV, y el reportero fluorescente mCherry.

Para ello fue necesario linealizarlos antes de la reacción; para los tres vectores luminiscentes se utilizó la enzima *Xba I* (Fermentas, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), mientras que para el reportero fluorescente se utilizó *Xho I* (Thermo Waltham, Massachusetts, Estados Unidos).

La purificación del RNA sintetizado fue hecha tal como lo señala Ambion, para así asegurarse de obtener transcritos con alta pureza, utilizando columnas de purificación, con el kit “RNA Total Extraction Kit” (OMEGA).

3.- Línea celular, cepa viral y condiciones de cultivo e infección.

3.1.- Cultivo Celular

Fue utilizada la línea Celular CHSE/F (ATCC® CRL1681), anteriormente conocida como CHSE-214, derivada de células embrionarias de *Leponis macrochirus* [Fryer & cols.; 1965]. Las células fueron mantenidas a 18° C, en ausencia de CO₂, en Medio

Mínimo Esencial (MEM), suplementado con 1X de aminoácidos no esenciales, 10 mM de HEPES, 1X de Solución Penicilina/Estreptomicina, 2.5 ug/mL de Anfotericina B y 10% de suero fetal bovino (MEM 10% SFB).

3.2.- Virus

Para realización de los estudios del efecto de la infección se contó con la cepa comercial de IPNV Hecht (HE) (ATCC® VR-1320™). Se utilizó una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 para todos los experimentos realizados.

Para la infección de los cultivos celulares, estos fueron lavados con PBS 1X, y luego fueron incubados por una hora con agitación ocasional con un inóculo viral en una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 preparado con medio MEM - 2% Suero Fetal Bovino (MEM 2% SFB). Transcurrido el tiempo de incubación, se eliminó el inóculo viral y se reemplazó por medio MEM 2% SFB Fresco. Las células fueron mantenidas a 18° C por 8 a 24 horas.

Tanto para los experimentos de infección, como de transfección se utilizaron células que estuvieran entre un 70 y 90 % de confluencia.

4.- Transfección de Células CHSE/F, Inmunofluorescencia y ensayo Dual Luc

4.1.- Transfección de Células CHSE/F

Para la transfección de DNA se utilizó Lipofectamina 3000 (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), mientras que para la de RNA se utilizó Lipofectamina MessengerMAX (Invitrogen), en ambos casos se siguieron las especificaciones del fabricante.

4.2.- Anticuerpos

Para los distintos experimentos realizados se utilizaron distintos anticuerpos, la información y descripción de los mismos se detalla en la tabla 4.

Tabla 4.- Anticuerpos y marcadores fluorescentes utilizados para inmunofluorescencia

Nombre	Tipo	Descripción	Referencia
Anti IPNV	Primario	Monoclonal mouse IgG2a (2F9/F1)	Ango, Austral Biologicals
Anti VP2	Primario	Monoclonal mouse IgG (Clon 1B3/E10)	Ango, Austral Biologicals
Anti VP1	Primario	Monoclonal rabbit	GenScript
Alexa Fluor 488	Secundario	Donkey pAB to Mouse IgG	ab cam
Alexa Fluor 594	Secundario	Donkey pAB to Rabbit IgG	ab cam
DAPI	Marcador Fluorescente	Marcador Fluorescente	Thermo Scientific

4.3.- Inmunofluorescencia

Se sembraron células CHSE/F en placas de 24 pocillos con coverslips, estas fueron transfectadas con los plasmidios codificantes de las proteínas virales y se dejaron

incubando distintos tiempos, dependiendo del experimento.

Para la inmunofluorescencia se eliminó el medio de cultivo y se lavaron las células 2 veces con 100 uL de PBS 1X frío, posteriormente fueron fijadas con 200 uL de metanol frío e incubadas a -20°C por 20 minutos. Se les retiró el metanol, y los restos del mismo con 2 lavados con PBS 1X frío.

La permeabilización de las células fue hecha con PBS-0,25% Tritón X-100, 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se eliminó la solución y se bloqueó con BSA 1% en PBS-0,1% Tween – 20.

Se incubaron las células 2 horas, en oscuridad en una cámara húmeda a 4°C, con alguno de los anticuerpos primarios (1:500), preparado en la solución de bloqueo; se retiró el exceso de este con 3 lavados de PBS-0,25% Tritón X-100. Luego se incubó con el anticuerpo secundario, según correspondiera, en las mismas condiciones que el primario durante 45 minutos, tras lo cual se lavó 3 veces con PBS-0,25% Tritón X-100. Los coverslips fueron finalmente incubados con DAPI (1:5000) (ThermoScientific) por 10 minutos, en oscuridad a temperatura ambiente y posteriormente lavados 2 veces en PBS-0,25% Tritón X-100 y agua. Se dejó secar 10 minutos a temperatura ambiente.

Para el montaje se ocupó el medio ProLong Gold Antifade reagent (Ambion), del cual fue depositada una gota sobre el portaobjeto, para a continuación colocar suavemente el coverslip boca abajo, presionar suavemente, eliminar exceso y dejar secar en oscuridad durante 30 minutos. Se sellaron los bordes con esmalte de uñas transparente y se dejó secar en oscuridad a 4°C por 24 horas antes de visualizar las muestras en microscopio de epifluorescencia XDS-3FL4 (OPTIKA, Ponteranica, Bérgamo, Italia).

4.4.- Ensayo Dual Luciferasa

Se utilizaron los reporteros bicistronicos dIHCV, dICrPV y dIΔEMCV (tabla 2). Para

determinar la actividad luciferasa de Renilla o Firefly se utilizó el ensayo Dual Luciferasa (Promega), con modificaciones respecto a las cantidades a utilizar de los reactivos LAR y Stop&Glow, manteniendo la proporción 1:1 de los mismos.

Los lisados, por lisis celular pasiva de los cultivos, fueron medidos en placas negras de 96 pocillos Nunclon (ThermoScientific) en el equipo Infinite m200 (TECAN) de acuerdo a las especificaciones del mismo para la medición de luminiscencia.

4.5.- Medición de Fluorescencia

Las células transfectadas con el reportero fluorescente mCherry fueron observadas con el microscopio de epifluorescencia XDS-3FL4 (OPTIKA) y fotografiadas. Para la medición de las unidades relativas de fluorescencia los cultivos fueron lisados, tal como las células transfectadas con los reporteros bicistrónicos luminiscentes, el lisado fue homogenizado y se midió fluorescencia a 610 nm en placas negras de 96 pocillos Nunclon (ThermoScientific) con el equipo Infinite m200 (TECAN).

4.6.- Análisis estadístico de datos y gráficos

Los datos brutos fueron corregidos en Excel de Microsoft Office 2010 (Redmond, Washington, Estados Unidos). Los análisis estadísticos y gráficos fueron realizados con GraphPad Prism 7.04 (La Jolla, California, Estados Unidos).

RESULTADOS

1.- Efecto de la infección viral en la traducción de proteínas celulares CAP e IRES dependientes.

La infección viral inhibe la traducción celular y no la viral. Para evaluar el efecto de la infección viral de IPNV en la traducción CAP e IRES dependiente se utilizaron RNAs de reporteros bicistrónicos. Se utilizaron 3 reporteros bicistrónicos diferentes con el objetivo de comparar los cambios en la traducción IRES dependiente, representados en la figura 2, dICrPV (A), que tiene el IRES de CrPV en la región intercistrónica; dIHCV (A), que contiene el IRES de HCV; y d Δ EMCV (B), con el IRES de EMCV truncado, de manera que no es capaz de reclutar la maquinaria de inicio de la traducción.

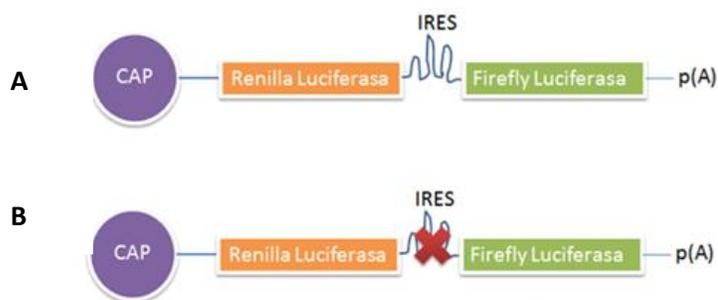


Figura 2.- Esquema de los RNA de reporteros bicistrónicos. Los reporteros bicistrónicos utilizados consisten en un RNA capeado poliadenilado compuesto de dos cistrones separados por una región intercistrónica. El primer cistron codifica para la proteína Renilla Luciferasa, y el segundo cistron para Firefly Luciferasa. En la región intercistrónica se encuentra el IRES viral de HCV o CrPV (A) o bien el IRES de EMCV truncado (B). Los reporteros utilizados fueron sintetizados a partir de los plasmidios dICrPV, d Δ EMCV y dIHCV (tabla 2) utilizando el Kit mMMESSAGE mMACHINE® T7 Ultra Kit.

Esto permitió analizar si en caso de existir cambios en los valores registrados estos eran producto de la acción del IRES o no.

Las Células CHSE/F, transfectadas con RNA, fueron infectadas con IPNV 30 horas post – transfección. Luego de 12 horas de infección, se determinó la actividad Renilla y Firefly Luciferasa para evaluar la traducción CAP e IRES dependiente.

Los resultados que se muestran en la figura 3 evidencian que existe disminución significativa de la traducción CAP dependiente producto de la infección para todos los RNAs bicistrónicos, particularmente la disminución de la actividad de Renilla Luciferasa (figura 3 A) es de un 15% para el reportero dICrPV, 64% para d Δ EMCV y 57% para dIHCV.

Por otro lado, la traducción IRES dependiente también es afectada por la infección de IPNV. La actividad Firefly Luciferasa, figura 3 B, aumentó significativamente para el caso del reportero dIHCV, en un 227%; los cambios no son significativos para dICrPV.

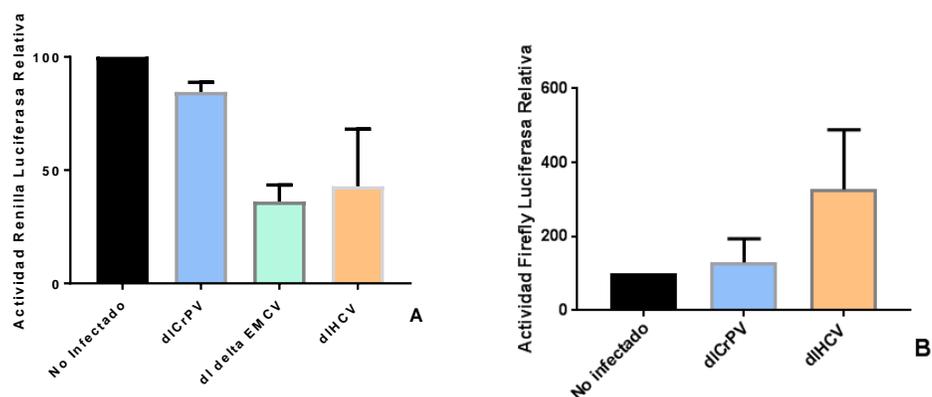


Figura 3.- Efecto de la infección de IPNV sobre la traducción CAP e IRES dependiente en células CHSE/F. Actividad Renilla Luciferasa relativa (A) de los reporteros dICrPV ($p < 0.005$), dIΔEMCV ($p < 0.0001$) y dIHCV ($p < 0.005$), y actividad Firefly Luciferasa relativa (B) de dICrPV y dIHCV ($p < 0.0001$) medida en lisado de células CHSE/F transfectadas con RNA e infectadas. Se compararon los valores medidos para cada uno de los distintos reporteros (dICrPV, dIΔEMCV y dIHCV) en células infectadas con los valores obtenidos para los mismos en células no infectadas (100%), representado como barra negra en A y B). Los datos brutos fueron corregidos, eliminando los valores medidos para células no tratadas. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba t-Student comparando los datos medidos para cada reportero transfectado en células sin infectar e infectadas.

2.- Efecto de las proteínas virales VP1, pVP2, VP2 y VP4 de IPNV en la traducción de RNAs celulares CAP e IRES dependientes por transfección en células.

2.1.- Clonamiento de las proteínas virales pVP2 y VP2

En el laboratorio se contaba con los plasmidios codificantes de las proteínas virales VP1 y VP4, pTriex3-VP1 y pTriex-VP4 respectivamente, por lo que se decidió construir un plasmidio codificante de la proteína viral estructural VP2 y de su precursora pVP2.

Para clonar los genes codificantes de éstos se usó como referencia la secuencia publicada de la cepa Jasper de IPNV (NC_001915.1) y para VP2 se consideró la secuencia que codifica para los primeros 442 aminoácidos publicada por Galloux M. & cols, se diseñaron partidores específicos (tabla 1).

Con el fin de obtener un fragmento puro de material genético en grandes cantidades se decidió que primero se clonarían los genes virales en pGEM-T y se recuperarían para ser ligados en el vector pcDNA3.1 (figura 4).

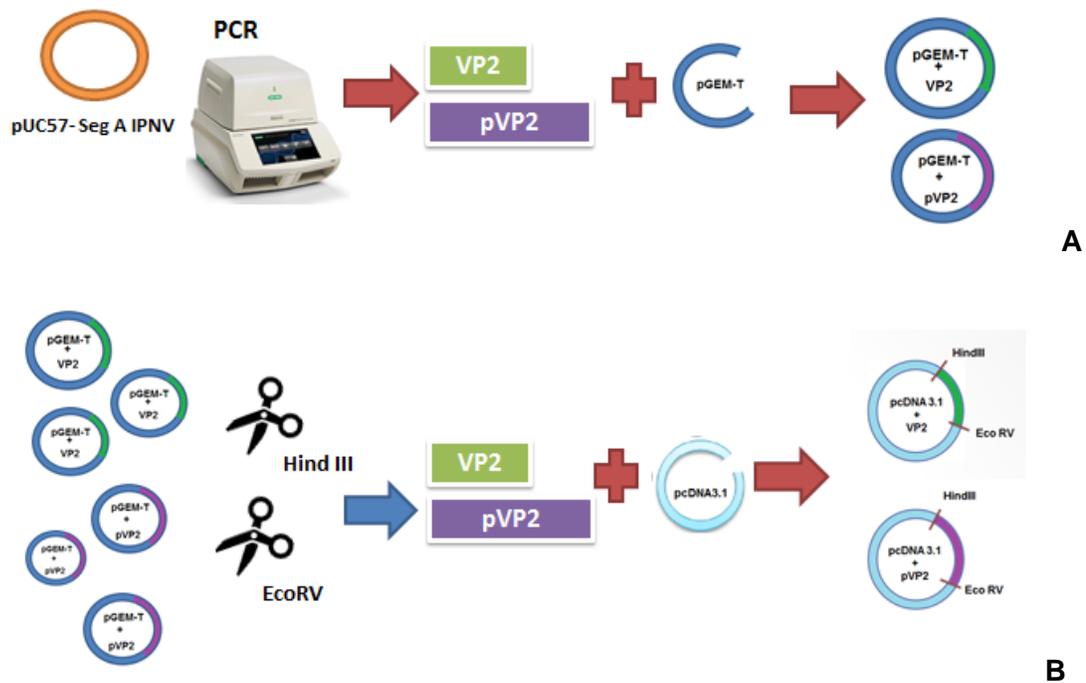
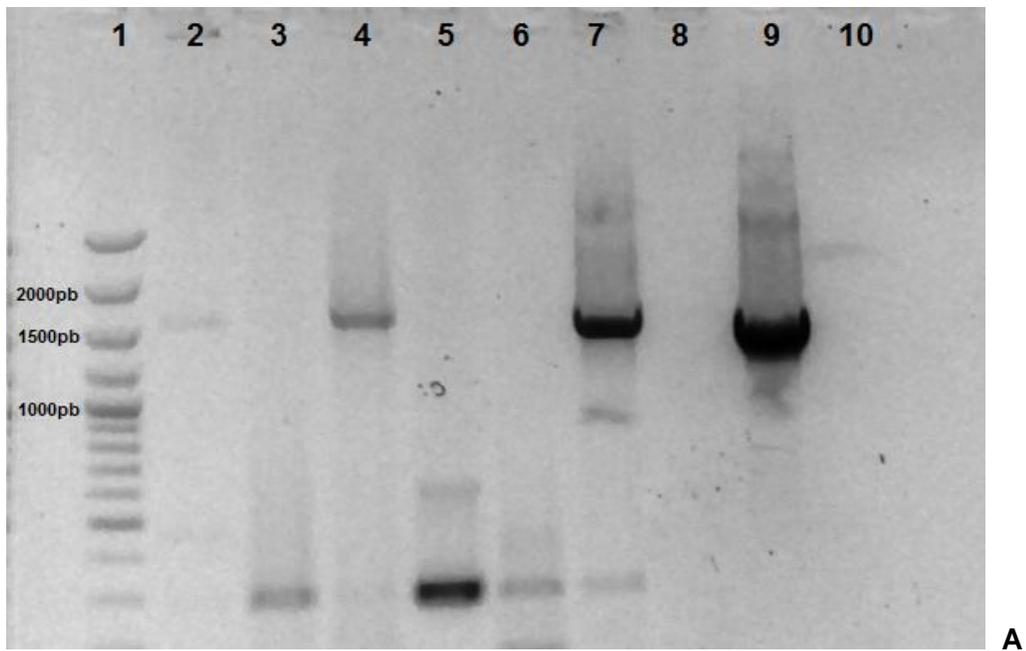


Figura 4.- Esquema de la metodología utilizada para el clonamiento de pVP2 y VP2. Se amplificaron los genes codificantes de pVP2 y VP2, los cuales fueron ligados a pGEM-T (A). Se transformaron células competentes *E. coli Novablue*, se purificaron los plásmidos resultantes y se cortó el material genético con las enzimas Hind III y EcoRV, se recuperaron los fragmentos y se ligaron a pcDNA3.1 (B).

Se amplificaron los genes, mediante PCR, desde el plásmido pUC57- Segmento A IPNV. Los fragmentos de DNA obtenidos (1545pb para pVP2, 1293pb para VP2) se ligaron al vector pGEM-T (figura 4 A). Los productos de ligación se utilizaron para transformar la cepa competente *Novablue* de *E.coli* y las colonias resistentes a ampicilina fueron seleccionadas y analizadas mediante PCR, para determinar la presencia de pGEM-T_pVP2 (Figura 5 A) y pGEM-T_VP2 (Figura 5 B).



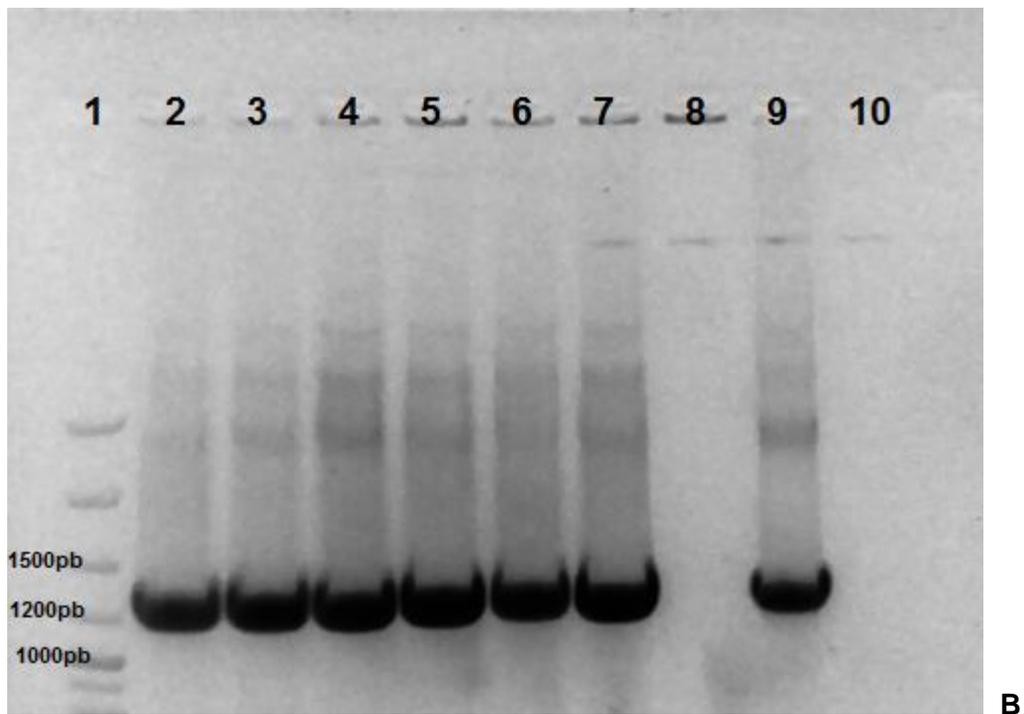


Figura 5.- PCR de Colonias para pGEM-T ligado a fragmento de pVP2 o VP2.

A) PCR de colonias para pVP2 de 6 colonias distintas de pGEM-T_pVP2 (carriles 2 al 7). 1: marcador de peso molecular GeneRuler™ 100bp Plus DNA; 8: Colonia transformada con producto de ligación vector pGEM-T solo; 9: Control Positivo pUC57-Seg A IPNV; 10: Agua Libre de Nucleasas. B) PCR de 6 colonias distintas de pGEM-T_VP2 (carriles 2 al 7). 1: marcador de peso molecular GeneRuler™ 100bp Plus DNA; 8: Colonia B transformada con producto de ligación vector pGEM-T solo; 9: Control Positivo pUC57-Seg A IPNV; 10: Agua Libre de Nucleasas.

Se recuperaron los fragmentos codificantes de las proteínas virales con las enzimas *Hind III* y *EcoRV*, éstos se ligaron entre los mismos sitios de restricción del plásmido pcDNA 3.1 (figura 5 B). Las colonias ampicilina resistentes obtenidas de la transformación de *E.coli Novablue* competentes fueron analizadas por PCR (Figura 6).

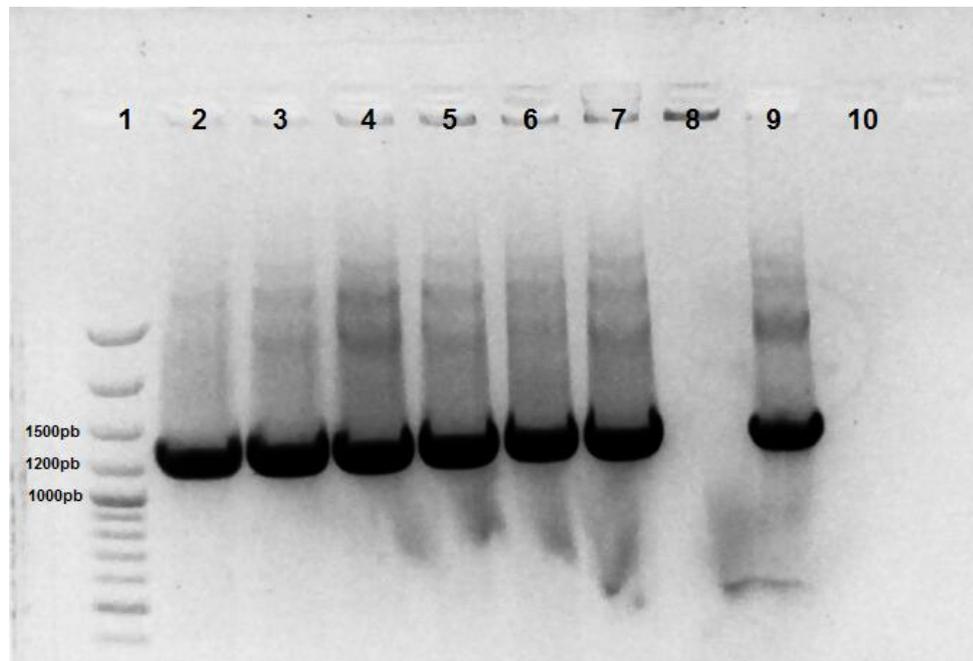
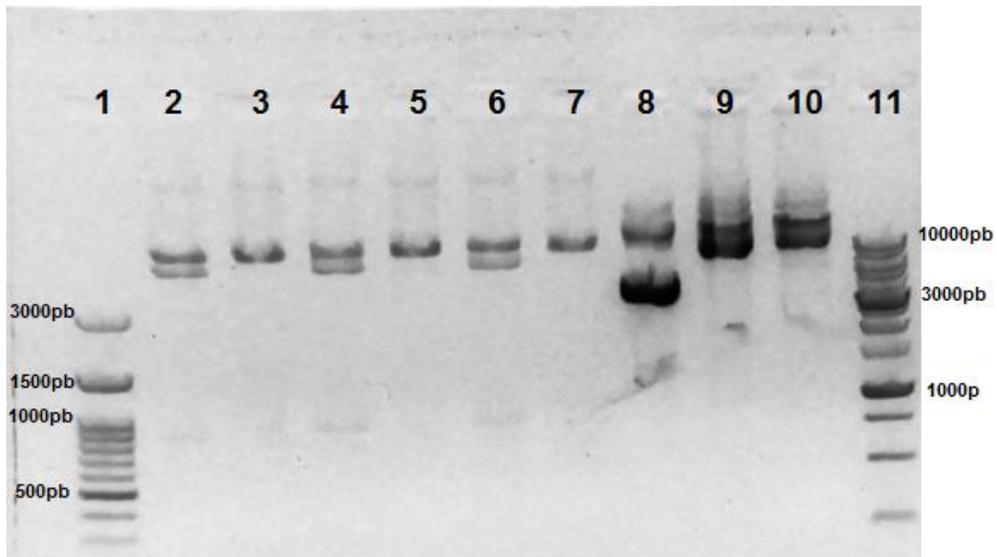
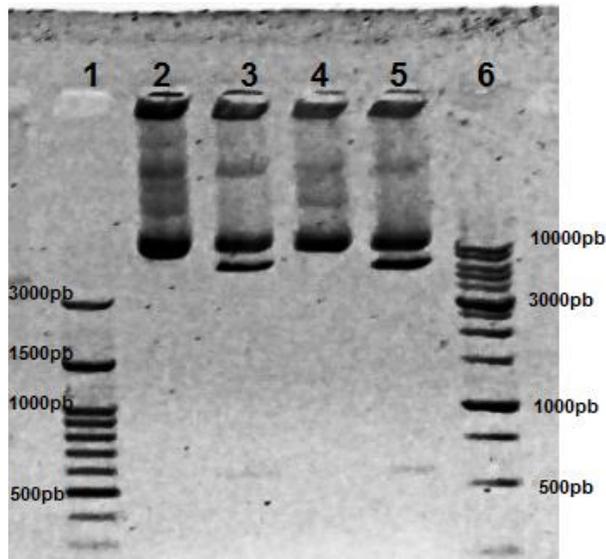


Figura 6.- PCR de Colonias para pcDNA3.1 ligado al fragmento codificante de VP2. PCR de 6 colonias distintas de pcDNA3.1- VP2 (carriles 2 al 7). 1: marcador de peso molecular GeneRuler™ 100bp Plus DNA (ThermoScientific); 8: Colonia B transformada con producto de ligación vector pcDNA3.1 solo; 9: Control Positivo pUC57-Seg A IPNV; 10: Agua Libre de Nucleasas.

Adicionalmente se verificó la presencia de los fragmentos codificantes de pVP2 y VP2 mediante digestión enzimática (figura 7)



A



B

Figura 7.- Verificación de los plasmidios pCDNA3.1-pVP2 y pCDNA3.1-VP2 con corte con enzima *Xho I* A) El DNA plasmidial obtenido de 3 colonias distintas de pCDNA3.1-pVP2 fue (carriles 2, 4, 6) o no (carriles 3, 5, 7) digerido con la enzima *Xho I*: AccuRuler 100bp Plus DNA RTU; 8: DNA plasmidial pCDNA3.1 – VP2 A; 9-10: DNA plasmidial pCDNA3.1 – pVP2 A. B) El DNA plasmidial obtenido de 2 colonial distintas de pCDNA3.1-pVP2 digerido (carriles 3 y 5) o no (carriles 2 y 4) con la enzima *Xho I*. 1: AccuRuler 100bp Plus DNA RTU; 6: AccuRuler 1 kb DNA RTU.

Se obtuvieron los plásmidos pcDNA 3.1-pVP2 y pcDNA 3.1-VP2 los cuales fueron utilizados para transfectar células CHSE/F

2.2.- Transfección de los plasmidios que codifican para las proteínas virales

Para comprobar que las células en cultivo transfectadas con los plasmidios codificantes de las proteínas virales las sintetizaban, se analizaron las células transfectadas mediante inmunofluorescencias, tal como se describe en materiales y métodos, utilizando distintos anticuerpos anti-proteínas virales (Tabla 3). Los resultado muestran que las células CHSE/F transfectadas con VP1 y VP2 expresan a las proteínas en el citoplasma celular (figura 8 A, D). No ocurre lo mismo con VP4 (figura 8 G). Respecto al marcaje del material genético con DAPI (figura 9 B, E), al comparar las imágenes con su respectiva contraparte, superposicionandolas (figura 8 C, F) que muestra el marcaje de los anticuerpos, es posible afirmar que las regiones no marcadas en A y D corresponden a los núcleos celulares.

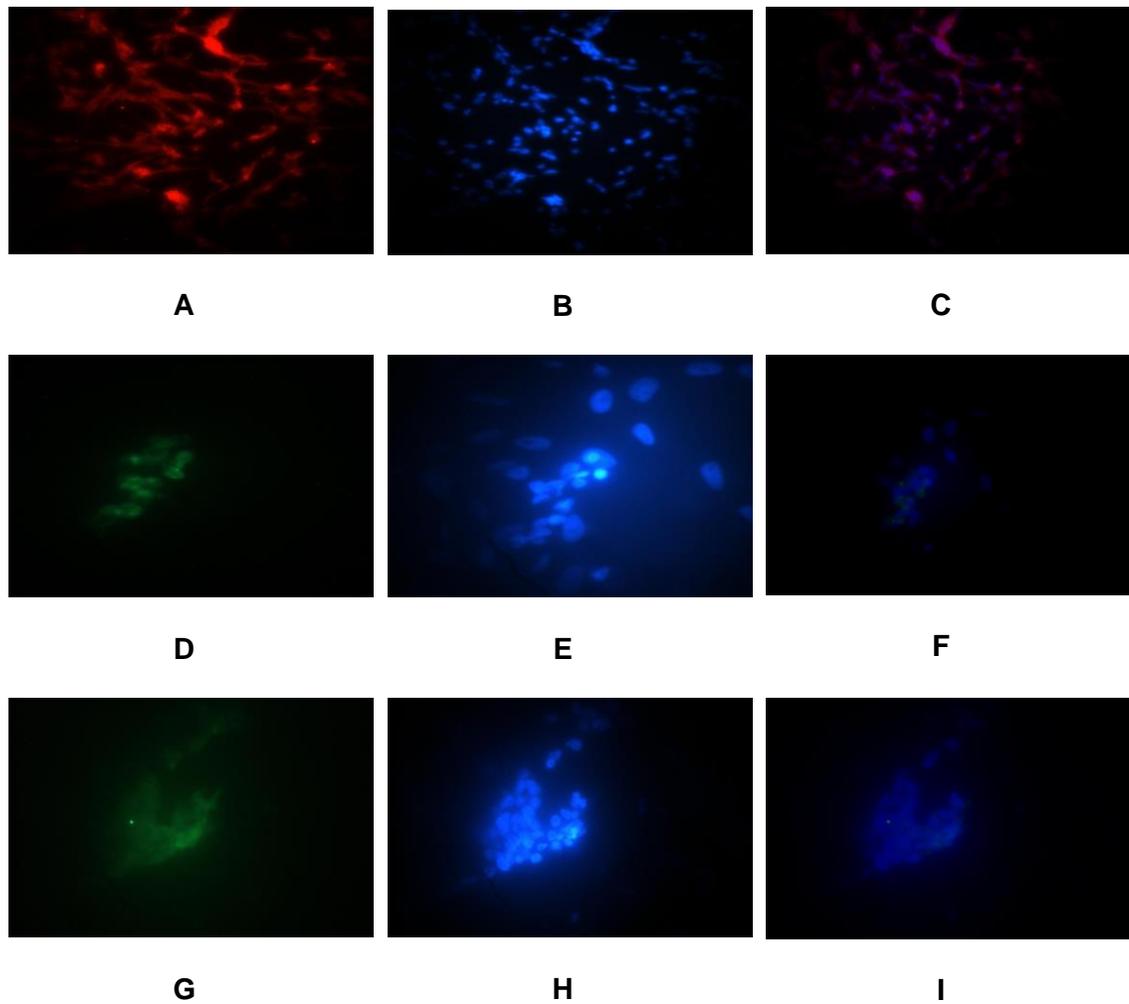


Figura 8.- Inmunofluorescencia de células CHSE/F transfectadas con proteínas virales VP1, VP2 y VP4. A- C: células CHSE/F transfectadas con el plasmidio pTriex3-VP1, incubadas con el anticuerpo primario Anti VP1 y anticuerpo secundario Alexa Fluor 594. D- I: células CHSE/F transfectadas con el plasmidio pcDNA3.1-VP2 (D-F) o pTriex3-VP4 (G-I), incubadas con el anticuerpo primario Anti VP2 (D-F) o Anti IPNV (G-I), y anticuerpo secundario Alexa Fluor 488. En B, E y H se muestran las células marcadas con DAPI, en C, F e I la superposición de la primera y segunda columna. Aumento 20x (A-C) y 40x (D-I).

Habiendo comprobado que las proteínas virales eran producidas en las células CHSE/F, se procedió a realizar el experimento de evaluación del efecto de cada una de ellas sobre

la traducción celular.

2.3.- Evaluación del efecto de las proteínas virales VP1, pVP2, VP2 y VP4 de IPNV en la traducción CAP e IRES dependientes por transfección en células.

Las células CHSE/F fueron transfectadas con el RNA y 2 horas después con el DNA de los vectores codificantes de las proteínas virales VP1, pVP2, VP2 y VP4, y el vector vacío pcDNA 3.1. Esto se hizo por separado pues con anterioridad se probaron los protocolos de transfección por separado, notando que la proteína reportera tenía un máximo de expresión a las 48 horas, y que el reactivo para la transfección de RNA podía llegar a ser más tóxico para las células, que el utilizado para la transfección de DNA. Luego de 48 horas se determinó la actividad de los reporteros.

En el caso de la proteína VP1, el resultado obtenido indica que en presencia de ésta la traducción CAP dependiente, reportada por la luminiscencia de Renilla Luciferasa disminuye en un 20%, para dICrPV y dI Δ EMCV, y tan solo un 7% para dIHCV (figura 9 A), sin embargo al realizar diferentes test estadísticos estos señalan que estas diferencias no son significativas.

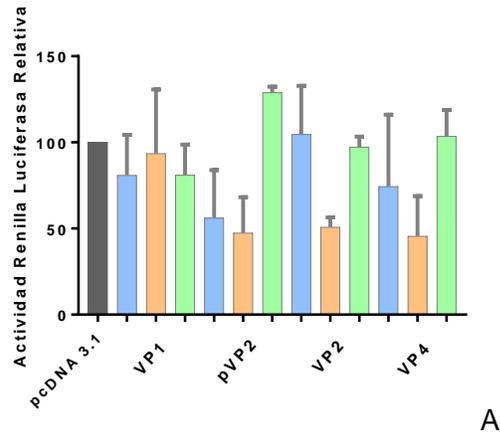
En el caso de VP4 se observa un fenómeno similar, los niveles de luminiscencia asociada a la traducción CAP-dependiente disminuyen en presencia de la proteína viral, 25 % y 55% para dICrPV y dIHCV respectivamente, mientras que para dL Δ EMCV no hay cambios (figura 9 A). Solo los cambios para dIHCV son significativos ($p < 0.0156$).

Para el caso de pVP2 la traducción CAP dependiente, disminuye en presencia de la proteína viral un 44% para dICrPV (no significativo) y 52% para dIHCV ($p < 0.0079$); y aumentan un 28% para dI Δ EMCV ($p < 0.0005$) (figura 9 A).

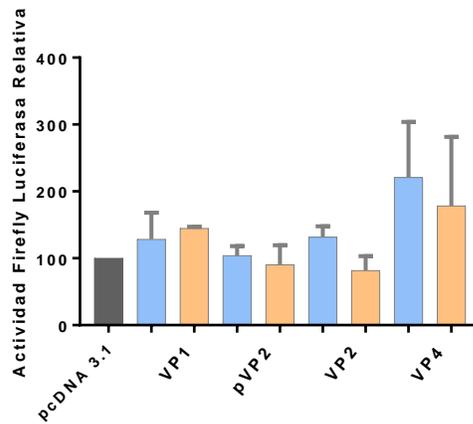
Finalmente para el caso de la proteína viral VP2 los datos informan que en presencia de ésta la traducción CAP dependiente tiende a mantenerse sin mayores cambios para

dICrPV y dIΔEMCV (aumento de 4% y disminución de 3%, respectivamente), y disminuye significativamente en un 50% para dIHCV ($p < 0.0001$) (figura 9 A).

Respecto a la traducción IRES dependiente hay cambios cuantitativos en presencia de las proteínas virales. Para el caso de VP1 la traducción IRES dependiente aumenta en un 28% (dICrPV) y 44% (dIHCV). Para pVP2 los cambios son menores, aumento de un 4% (dICrPV) y disminución en un 10% (dIHCV). En el caso de la proteína viral estructural VP2 se midió un aumento de un 31% para dICrPV y una disminución de un 19% para dIHCV. Los mayores cambios son para VP4, donde se registró un aumento de la actividad relativa Firefly Luciferasa en un 120% para dICrPV y 78% para dIHCV. Sin embargo al realizar distintos análisis estadísticos se da cuenta de que estos cambios no son significativos.



A



B

Figura 9 Efecto de las proteínas virales de IPNV VP1, pVP2, VP2 y VP4 sobre la traducción CAP e IRES dependiente en células CHSE/F. Se transfectaron células CHSE/F con reporteros bicistrónicos, dCrPV (azul), dIHCV (naranja) y dΔEMCV (verde); y plasmidios codificantes de las proteínas virales, VP1, pVP2, VP2, VP4 o pcDNA3.1 vacío. A) Actividad Renilla Luciferasa relativa de células CHSE/F transfectadas. B) Actividad Firefly Luciferasa relativa de células CHSE/F transfectadas. Los datos crudos fueron corregidos, eliminando los valores de luminiscencia obtenidos de los lisados de células no tratadas. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba t-Student comparando los datos medidos para cada reportero transfectado con el plasmidio de alguna proteína viral versus aquel transfectado con el vector vacío.

DISCUSIÓN

Los virus son parásitos intracelulares obligados, por lo que requieren y dependen de la maquinaria celular traduccional para completar su ciclo replicativo. Anteriormente otros trabajos han descrito que durante la infección viral de IPNV ocurre una inhibición de la síntesis de proteínas celulares (Chen L. & cols, 2013. Gamil & cols; 2015), evento que favorece la traducción los mRNAs virales (Gamil & cols; 2015. Gamil & cols; 2016). En este seminario de título se evaluó el efecto de la infección de IPNV y de las proteínas virales VP1, VP2, pVP2 y VP4 en la traducción de los mRNAs bicistrónicos que contienen reporteros CAP e IRES dependientes de la línea celular CHSE/F.

En general los análisis estadísticos señalan que no hay cambios significativos en presencia de partículas virales, sin embargo esto es producto del tamaño de la muestra (Fay D.S. & Gerow K.; 2013), que al ser muy pequeña ($n < 30$) no refleja la tendencia a la disminución de la producción de proteínas CAP dependientes como resultado de la infección o presencia de proteínas virales.

Respecto a los experimentos, en el realizado para evaluar el efecto de la infección de IPNV se comprobó que ésta causa una disminución en la traducción CAP dependiente de los mRNAs (figura 3 A), esto ha sido reportado con anterioridad para otros virus, incluido IPNV (Chen L. & cols, 2013. Gamil & cols; 2015).

También se observó que producto de la infección se registra un aumento de la traducción IRES dependiente (figura 3 B), con ello se da cuenta de que IPNV utiliza éste como mecanismo alternativo para la síntesis de sus proteínas virales.

Estos resultados concuerdan con investigaciones anteriores del grupo de estudio del laboratorio en que fue realizado este trabajo, en las cuales se logró comprobar la presencia de un IRES en la región 5'UTR del segmento A (Rivas-Aravena A. & cols; 2017). En análisis futuros será necesario entonces realizar experimentos con un reportero que incluya dicho IRES, con el fin de medir adecuadamente cuán importante es el efecto de la infección en la traducción IRES dependiente del virus. Además se debe investigar respecto a la existencia de un IRES en la región 5'UTR del Segmento B y determinar cuáles son los factores de inicio de la traducción y factores proteicos trans-activadores de IRES que requieren los IRES de IPNV para comenzar el proceso de síntesis de las proteínas virales.

Los resultados obtenidos en el experimento de evaluación del efecto de las proteínas virales sugieren que las proteínas virales pueden inhibir la traducción CAP dependiente (figura 9 A). VP1, la RNA polimerasa dependiente de RNA, Vpg cuando se encuentra unida al extremo 5' de cada hebra de RNA, inhibe la traducción CAP dependiente, según los resultados obtenidos para los tres reporteros utilizados, mientras que estimula la traducción IRES dependiente. Ésto había sido reportado anteriormente para otras proteínas Vpg en experimentos *in vitro* e *in vivo*, particularmente en Calicivirus felino (Herbert T.P. & cols; 1997) y Potyvirus (Eskelin K. & cols; 2011). Si bien estas proteínas virales son distintas en tamaño entre sí, las proteínas Vpg de Calicivirus son de entre 13 a 15 kDa (Goodfellow I.; 2011), mientras que las de potyvirus es de 21,9 kDa (Puurand U. & cols, 1994), todos estos virus tienen mecanismos alternativos a la traducción CAP dependiente, y ha sido reportado que son capaces de unirse directamente al complejo eIF4F (Herbert T.P. & cols; 1997. Goodfellow L. & cols; 2005. Eskelin K. & cols; 2011). En futuros experimentos será importante determinar el rol de Vpg en la traducción celular

y si la inhibición de la síntesis de proteínas celulares varía dependiendo de si la proteína se encuentra libre como VP1 o unida al RNA como Vpg.

En presencia de VP4 también se registró una disminución de la traducción CAP dependiente y estimulación de la traducción IRES dependiente, lo cual podría ser esperable si se considera que las proteasas virales de otros virus normalmente participan en el shut-off de la traducción de los mRNAs de las células blanco, tal como ha sido reportado (Etchinson D. & cols; 1982. Haghghat & cols; 1996. Willcocks M.M. & cols; 2004. Castelló A. & cols; 2009).

Respecto a los resultados obtenidos para la proteína viral VP2 y su precursora pVP2, estos no son concluyentes ya que, no hay una tendencia clara que indique que hay inhibición de la traducción CAP dependiente y estímulo del mecanismo alternativo. VP2 solo disminuye la síntesis de proteínas Renilla Luciferasa, CAP dependientes, en el caso del reportero dIHCV; y pVP2 disminuye la traducción canónica en un 50% para dICrPV y dIHCV, pero aumenta en el caso de dIHCV. De todas formas tiene sentido que VP2 no genere cambios en la traducción celular, ya que esta proteína viral aparece al momento de la maduración de la cápside viral, lo que ocurre momentos antes de la liberación del virus, cuando las partículas virales abiertas constituidas por pVP2 se cierran por el corte proteolítico del extremo C-terminal de la proteína viral, apareciendo VP2 en el momento de maduración del virus (Villanueva R. & cols; 2004).

En la bibliografía tampoco hay reportes de inhibición de la traducción CAP dependiente producto de las proteínas virales estructurales, salvo por el caso de Coronavirus, virus asociados a enfermedades respiratorias en animales y humanos, siendo la proteína S

(de Spike, espiga, en inglés) la responsable de inhibir la traducción de ciertos genes de la célula huésped, particularmente genes asociados a la respuesta inmune que se activa por la infección (Xiao H. & cols; 2008).

Serán necesarios nuevos experimentos y análisis para entender el posible rol de pVP2 en la inhibición de la traducción CAP dependiente, para así entender si las diferencias registradas para dICrPV, d Δ EMCV y dIHCV puedan tener relación con la cantidad de proteína acumulada en las células.

Respecto a las diferencias registradas en la inhibición de la traducción CAP dependiente producto de la infección viral y la presencia de pVP2, VP2 o VP4, se debe tener en cuenta los distintos momentos en que las proteínas están presentes durante el ciclo viral, pVP2 y VP4 aparecen por el corte proteolítico de la poliproteína codificada por el segmento A, mientras que VP2 es parte de la cápside madura, como fue mencionado antes.

Para entender las diferencias registradas en los niveles de actividad Firefly Luciferasa relativa registrados para los distintos reporteros bicistrónicos hay que tener en consideración que la estabilidad de la estructura del IRES depende de la temperatura (Komar A. & Hatzoglou M; 2005). En el caso del IRES de CrPV, un virus que afecta a los grillos, cuya temperatura corporal depende de la temperatura ambiente y funciona también como mecanismo de protección frente a la infección (Cevallos R.C. & Sarnow P.; 2010), el IRES adquiere una estructura secundaria capaz de sustituir el Met-tRNA_i, por lo que la traducción de los mRNAs virales depende completamente de que la secuencia del IRES adquiera su estructura correspondiente, lo cual no ha de ocurrir a

15°C, temperatura a la que se mantienen las células CHSE/F. Ocurre lo mismo con HCV, un virus que afecta a los seres humanos, cuyo organismo funciona a 37°C (Song H. & cols; 2010), aunque la diferencia podría tener relación con que el IRES de este virus requiere de eIF3, eIF2 y Met-tRNA_i (Sizoua D.V. & cols; 1998), y por ende la traducción no depende tan solo de la estructura secundaria, sino que también de la disponibilidad de dichos factores de inicio de la traducción y el tRNA de inicio de la traducción.

Por último es importante destacar la relevancia de la comprensión de la presencia de la estructura IRES y del mecanismo de traducción IRES dependiente. Si bien estas estructuras y el mecanismo de traducción fueron primeramente descubiertas y descritas en virus, se cree que entre un 10 a 15% de los mRNAs de mamíferos contienen IRES (Spriggs K.A. & cols; 2008) y aquellos ya descritos codifican mayormente para factores de transcripción, factores de crecimiento y transportadores (Lacerda R & cols.; 2017). Los IRES celulares parecen ser menos estructurados que los IRES virales (Komar A.A. & Hatzoglou M.; 2005) y se cree que son activados por cambios estructurales en su estructura secundaria producto de condiciones de estrés celular (Leppek K. & cols., 2018).

Por ende se puede señalar que los IRES no solo son una ventaja para los virus al momento de generar sus proteínas en las células infectadas, sino que también son de gran relevancia para la supervivencia de células eucariontes, que pueden contar con este mecanismo para asegurar la producción de proteínas esenciales para su sobrevivencia.

CONCLUSIÓN

Las principales conclusiones de este seminario de título son:

- El virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa inhibe la traducción CAP dependiente y estimula la traducción IRES dependiente en las células CHSE/F.
- Se obtuvieron plasmidios codificantes para la proteína viral estructural VP2 y su precursora pVP2.
- Las proteínas virales VP1, pVP2, VP2 y VP4 inhiben la traducción CAP dependiente.
- Las proteínas virales VP1 y VP4 estimulan la traducción IRES dependiente.

Por lo tanto, es posible decir que la hipótesis de este trabajo es cierta y que se lograron los objetivos propuestos para este seminario de título.

BIBLIOGRAFÍA

- Ali, N.; Prujin, G.J.; Kenan, D.J.; Keene, J.D.; Siddiqui, A.** 2000 "*Human La antigen is required for Hepatitis C virus Internal ribosomal entry site-mediated translation*" J.Biol.Chem. **275**(36): 27531-27540.
- Belsham, G. J.; Sonenberg, N.** 1996. "*RNA-protein interactions in regulation of picornavirus RNA translation*". Microbiol. Rev. **60**(3): 499-511.
- Bieleski, L.; Talbot, S. J.** 2001 "*Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus vCyclin open reading frame contains an internal ribosome entry site*" J.Virol **75**(4): 1864-1869.
- Blyn, L. B.; Towner, J. S.; Semler, B. L.; Ehrenfeld, E.** 1997 "*Requirement of poly(rC) binding protein 2 for translation of poliovirus RNA*" J. Virol. **71**: 6243-6246.
- Borman, A.M.; Kean, K.M.** 1997. "*Intact eukaryotic initiation factor 4G is required for Hepatitis A virus internal initiation of translation*" Virol. **237**(1): 129-136.
- Borman, A.M.; Michel, Y.M.; Kean K.M.** 2001 "*Detailed analysis of the requirements of Hepatitis A virus internal ribosome entry site for the eukaryotic initiation factor complex eIF4F*" J. Virol. **75**(17): 7864-7871.
- Bradford, M.M.** 1976. "*A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.*" Anal. Biochem. Rev. **72**:248-254.
- Calvert, J.G.; Nagy, E.; Soler, M.; Dobos, P.** 1991. "*Characterization of the VPg-dsRNA linkage of the infectious pancreatic necrosis virus*" J. Gen. Virol. **2**: 2563-2567.
- Castelló, A.; Franco, D.; Moral-López, P.; Berlanga, J. J.; Álvarez, E.; Wimmer, E.; Carrasco, L.** 2009 "*HIV- 1 Protease Inhibits Cap- and Poly(A)-Dependent Translation upon eIF4GI and PABP Cleavage*" PLoS ONE **4**(11): e7997.

- Cevallos, R.C.; Sarnow, P.** 2010 “*Temperature protects insect cells from infection by Cricket Paralysis Virus*” J. Virol. **84**(3): 1652 – 1655.
- Chen, L.; Evensen, O.; Mutoloki, S.** 2013 “*Delayed protein shut down and cytopathic changes lead to high yields of infectious pancreatic necrosis virus cultured in Asian grouper cells*” J. Virol. Methods 2013.
- Conte, M. R.; Grune, T.; Ghuman, J.; Kelly, G.; Ladas, A.; Matthews, S.; Curry, S.** 2000 “*Structure of tandem RNA recognition motifs from polypyrimidine tract binding protein reveals novel features of the RRM fold*” EMBO **19**: 3132-3141.
- Costa-Mattioli, M.; Svitkin, Y.; Sonenberg, N.** 2004 “*La autoantigen is necessary for optimal function of the poliovirus and Hepatitis C virus internal ribosomal entry site in vivo and in vitro*” Mol.Cell Biol. **24**(15):6861-6870.
- Das S.; Maitra U.** 2001. “*Functional significance and mechanism of eIF5-promoted GTP hydrolysis in eukaryotic translation initiation*” Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **70**: 207 - 231.
- de Breyne, S.; Yu, Y.; Pestova, T. V.; Hellen, C. U.** 2008 “*Factor requirements for 436 translation initiation on the Simian picornavirus internal ribosomal entry site.*” RNA **14**(2): 367-380.
- Dobos P.** 1993. “*In vitro guanylation of Infectious Pancreatic Necrosis Virus polypeptide VP1.*” Virol. **193**: 403-413.
- Dobos P.** 1996. “*The Molecular Biology of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV).*” Annual Review of Fish Diseases, Vol **5**: 25-54.
- Eskelin, K.; Hafren, A.; Rantalainen, K.I.; Makinen, K.** 2011 “*Potyviral VPg enhances viral RNA translation and inhibits reporter mRNA translation in planta*” J Virol **85**: 9210–9221.
- Etchison, D.; Milburn, S.C.; Edery, I.; Sonenberg, N.; Hershey, J.W.** 1982 “*Inhibition*

of HeLa cell protein synthesis following poliovirus infection correlates with the proteolysis of a 220,000-dalton polypeptide associated with eucaryotic initiation factor 3 and a cap binding protein complex” J Biol Chem **257**: 14806–14810.

Fryer, J. L.; Yusha, A.; Pilcher, K. S. 1965 “*The in vitro cultivation of tissue and cells of Pacific salmon and steelhead trout*” *Annals of the New York Academy of Sciences* **126**: 566–586.

Galloux, M.; Chevalier, C.; Henry, C.; Huet, J.-H. ; Da Costa, B.; Delmas, B. 2004 “*Peptides resulting from the pVP2 C-terminal processing are present in infectious pancreatic necrosis virus particles.*” *J. Gen. Virol.* **85**: 2231-2236.

Gamarnik, A. V.; Andino, R. 1997 “*Two functional complexes formed by KH domain containing proteins with the 5’ noncoding region of poliovirus RNA*” *RNA* **3**: 882-892.

Gamarnik, A. V.; Andino, R. 2000 “*Interactions of viral protein 3CD and Poly(rC) binding protein with the 5’ untranslated region of the poliovirus genome.*” *J. Virol.* **74**: 2219-2226.

Gamil, A.A.; Mutoloki, S.; Evensen, O. 2015. “*A Piscine Birnavirus Induces Inhibition of Protein Synthesis in CHSE-214 Cells Primarily through the Induction of eIF2 α Phosphorylation.*” *Viruses. Rev* **7**: 1987-2005.

Gamil, A.A.; Xu, C.; Mutoloki, S.; Evensen, O. 2016 “*PKR Activation Favors Infectious Pancreatic Necrosis Virus Replication in Infected Cells*”. *Viruses* **8**(6):173.

Garner, J.N., Joshi, B., Jagus, R. 2003 “*Characterization of rainbow trout and zebrafish eukaryotic initiation factor 2 alpha and its response to endoplasmic reticulum stress and IPNV infection.*” *Dev. Comp. Immunol* **27**: 217–231.

Goodfellow I. 2011 “*The genome-linked protein VPg of vertebrate viruses – a multifaceted protein*” *Crr Opin Virol.* **1**(5): 355-362.

- Haghighat, A.; Svitkin, Y.; Novoa, I.; Kuechler, E.; Skern, T., Sonenberg, N.** 1996. "The eIF4G-eIF4E complex is the target for direct cleavage by the rhinovirus 2A proteinase" *J. Virol.* **70** (12), 8444–8450.
- Hentze, M.W.** 1997 "eIF4G – A multipurpose ribosome adapter?" *Science* **225**(5299): 500-501.
- Herbert, T.P.; Brierley, I.; Brown, T.D.K.** 1997 "Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation" *J. of General Virol.* **78**: 1033 – 1040.
- Hill, B.; Way, K.** 1995 "Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and others aquatic Birnaviruses" *Annual Rev. of Fish Diseases*, Vol **5**: 55-77.
- Huang, H. L.; Wu, J. L.; Chen, M. H.; Hong, J. R.** 2001 "Aquatic birnavirus-induced ER stress-mediated death signaling contribute to downregulation of Bcl-2 family proteins in salmon embryo cells". *PloS one* **6**(8): e22935.
- Imataka, H.; Gradi, A.; Sonenberg, N.** 1998 "A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation" *Embo. J.* **17**: 7480-9.
- Jan, E.; Sarnow, P.** 2002 "Factorless Ribosome Assambly on the Internal Ribosome Entry Site of Cricket Paralysis Virus" *J. Mol. Biol.* **324**:889-902.
- Julin, K.; Johansen, L.-H.; Sommer, A.-I.-; Jorgensen, J.B.** 2014 "Persistent infections with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) of different virulence in Atlantic salmon, *Salmo salar L*" *Journal of Fish Diseases* 2014.
- Kahvejian, A.; Roy, G.; Sonenberg, N.** 2001 "The mRNA closed-loop model: The function of PABP and PABP-interacting proteins in mRNA translation" *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **66**: 293-300.

- Kieft, J.S.** 2008 “*Viral IRES RNA structures and ribosome interactions.*” Trends in biochemical sciences **33**(6): 274-83.
- Komar, A.; Hatzoglou, M.** 2005 “*Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence*” J Biol Chem **280**: 23425-23428.
- Kozak, M.** 1986 “*Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes*” Cell **44**: 283-292.
- Lacerda R.; Menezes J.; Romao L.** 2017 “*More than just scanning: the importance of cap-independent mRNA translation initiation for cellular stress response and cancer*” Cell.Mol.Life Sci. **74**(9):1659 – 1680.
- Lamphear, B.J.; Kirchweger, R.; Skern, T.; Rhoads, R.E.** 1995 “*Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases— implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation*” J. Biol. Chem. **270** (37): 21975–21983.
- Lamphear, B.J.; Yan, R.Q.; Yang, F.; Waters, D.; Liebig, H.D.; Klump, H.; Kuechler, E.; Skern, T.; Rhoads, R.E.** 1993 “*Mapping the cleavage site in protein synthesis initiation factor-eIF-4G of the 2A proteases from human Coxsackievirus and rhinovirus*” J. Biol. Chem. **268** (26), 19200–19203.
- Lee, J.H.; Pestova, T.V.; Shin, B.S.; Cao, C.; Choi, S.K. Dever, T.E.** 2002 “*Initiation factor eIF5B catalyzes second GTP-dependent step in eukaryotic translation initiation*” Proc Natl Acad Sci USA **99**: 16689 - 16694.
- Levican, J.; Miranda-Cardenas, C.; Soto-Rifo, R.; Aguayo, F.; Gaggero, A.; León, O.** 2017 “*Infectious Pancreatic Necrosis Virus enters CHSE-214 cells via macropinocytosis*” Scientific Reports **7**:3068.
- Leppek K.; Das R.; Barna M.** 2018 “*Functional 5’UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them*” Nat. Rev. Mol Cell. Bio. **19**(2):158-174.

- Liu, G.; Yanguéz, E.; Chen, Z.; Li, C.** 2011 “*The duck hepatitis virus 5'-UTR possesses HCV-like IRES activity that is independent of eIF4F complex and modulated by downstream coding sequences*” *Virology* **8**: 147.
- Malsberger, R.G.; Cerini, C.P.** 1965 “*Multiplication of Infectious pancreatic necrosis virus*” *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **126**: 320-327.
- Matsuo, H.; Li, H.; McGuire, A.M.; Fletcher, C.M.; Gingras, A.C.; Sonenberg, N.; Wagner G.** 1997 “*Structure of translational factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein*” *Nat. Struct. Biol.* **4**(9): 717-724.
- Nicholson, M. G.; Rue, S. M.; Clements, J. E.; Barber, S. A.** 2006 “*An internal ribosome entry site promotes translation of a novel SIV Pr55(Gag) isoform*” *Virology* **349**(2): 325-334.
- Orpetveit, I.; Kuntziger, T.; Sindre, H.; Rimstad, E.; Dannevig, B.** 2012 “*Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) from salmonid fish enters, but does not replicate in mammalian cells*” *J.Virology* **9**:228.
- Pelletier, J.; Sonenberg, N.** 1988 “*Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA*” *Nature* **334**(6180):320-5.
- Pestova, T.V.; Borukhov, S.I.; Hellen, C.U.** 1998 “*Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons*” *Nature* **394**(6696): 854-859.
- Pestova, T.V.; Hellen, C.U.** 2003 “*Translation elongation after assembly of ribosomes on the Cricket paralysis virus internal ribosomal entry site without initiation factors or initiator tRNA.*” *Genes Dev.* **17**: 181–186.
- Pilipenko, E. V., Pestova, T. V., Kolupaeva, V. G., Khitrina, E. V., Poperechnaya, A. N., Agol, V. I.; Hellen, C. U. T.** 2000 “*A cell cycle-dependent protein serves as a template-specific translation initiation factor*” *Genes Dev.* **14**: 2028-2045.

- Pudi, R.; Abhiman, S.; Srinivasan, N.; Das, S.** 2003 “*Hepatitis C virus internal ribosomal entry site-mediated translation is stimulated by specific interaction of independent regions of human La autoantigen*” J. Biol. Chem. **278**(14): 12231-12240.
- Puurand Ü., Mäkinen K., Paulin L., Saarma M.** 1994. “*The nucleotide sequence of potato virus A genomic RNA and its sequence similarities with other potyviruses*” J. Gen. Virol. 75:457–461.
- Reineke, L.C.; Merrick, W.C.** 2009 “*Characterization of the functional role of nucleotides within the URE2 IRES element and the requirements for eIF2A-mediated repression*” RNA **15**(12): 2264-2277.
- Rivas-Aravena, A.; Muñoz, P.; Jorquera, P.; Díaz, A.; Reinoso, C.; González-Catrilebún, S.; Sandino, A.** 2017 “*Study of RNA-A Initiation Translation of the Infectious Pancreatic Necrosis Virus*” Virus Research; Vol **240**: 121-129.
- Rogers, G.W. Jr.; Ritcher, N.J.; Merrick, W.C.** 1999 “*Biochemical and kinetic characterization of the RNA helicase activity of eukaryotic initiation factor 4A*” J. Biol. Chem. **274**(18): 12236 – 12244.
- Roberts, R.J.; Pearson, M.D.** 2005 “*Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.*”.Journal of Fish Diseases; **28**: 383–390.
- Santi, N.; Song, H.; Vakharia, V.; Evensen, O.** 2005 “*Infectious Pancreatic Necrosis Virus VP5 is Dispensable for Virulence and Persistence*” J. Virol; **79**: 9206-9216.
- Shatkin, A. J.** 1976 “*Capping of eukaryotic mRNAs*” Cell; **9**: 645-653.
- Sherf, B.A.; Navarro, S.L.; Hannah, R.R.; Wood, K.V.** 1996 “*Dual-Luciferase™ Reporter Assay: An advanced co-reporter technology integrating Firefly and Renilla Luciferase assays*” Promega Notes Magazine **57**: p.02.
- Sizoua, D.V.; Kolupaeva, V.G.; Pestova, T.V.; Shatsky, I.N.; Hellen, C.U.** 1998 “*Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated*

regions of Hepatitis C virus and Classical Swine Fever virus RNAs” J. Virol. **72**(6): 4775-4782.

Sommergruber, W.; Ahorn, H.; Klump, H.; Seipelt, J., Zoepfel, A.; Fessi, F.; Krystek, E.; Blaas, D.; Kuechler, E.; Liebig, H.D.; Skern, T. 1994 “2A proteinases of Coxsackie and rhinovirus cleave peptides derived from eIF-4G via a common recognition motif” Virol. **198**(2):741-745.

Somogyi, P.; Dobos, P. (1980) “Virus-Specific RNA Synthesis in Cell Infected by Infectious Pancreatic Necrosis Virus” J.Virol; **33**(1), 129-139.

Song, H.; Li, J.; Shi, S.; Yan, L. ; Zhuang, H. ; Li, K. 2010 “Thermal stability and inactivation of hepatitis C virus grown in cell culture” J. Virol. **7**:40.

Spriggs K.A.; Stoneley M.; Bushell M.; Willis A.E. 2008 “Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate” Biol. Cell. **100**(1):27 – 38.

Tate, H.; Kodama, H.; Izawa, H. (1990) “Immunosuppressive effect of infectious pancreatic virus on Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)” The Japanese Journal of Veterinary Science **52**(5):931-937.

Tarun, S.Z. Jr.; Sachs, A.B. 1996 “Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G” Emb. J. **15**: 7168-77.

Terenin, I.M.; Smirnova, V.V.; Andreev, D.E.; Dmitriev, S. E.; Shatky I.N. 2016 “A researcher’s guide to the galaxy of IRESs” Cell. Mol. Life Sci. **74**(8): 1431-1455.

Vagner, S.; Galy, B.; Pyronnet, S. (2001) “Irresistible IRES: Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites” EMBO Rep. **2**: 893-893.

Villanueva, R.; Galaz, J.; Valdés, J.; Jashés, M.; Sandino, A. (2004) “Genome assembly and particle maturation of Birnavirus Infectious Pancreatic Necrosis Virus” J. Virol **78**(24): 13829-13838.

Weill, L.; James, L.; Ulryck, N.; Chamond, N.; Herbreteau, C. H.; Ohlmann, T.; Sargueil, B. 2010 "A new type of IRES within gag coding region recruits three initiation complexes on HIV-2 genomic RNA" *Nucleic acids research* **38**(4): 1367-1381.

Willcocks, M. M.; Locker, N.; Gomwalk, Z.; Royall, E.; Bakhshesh, M.; Belsham, G. J.; Idamakanti, N.; Burroughs, K. D.; Reddy, P. S.; Hallenbeck, P. L.; Roberts, L. O. 2011 "Structural features of the Seneca Valley virus internal ribosome entry site (IRES) element: a picornavirus with a pestivirus-like IRES" *J. Virol.* **85**(9): 4452-4461.

Willcocks, M.M.; Carter, M.J.; Roberts, L.O. 2004 "Cleavage of eukaryotic initiation factor eIF4G and inhibition of host-cell protein synthesis during feline calicivirus infection" *J Gen Virol* **85**: 1125–1130.

Wilson, J.E.; Pestova, T.V.; Hellen, C.U.; Sarnow, P. 2000 "Initiation of protein synthesis from the A site of the ribosome" *Cell* **102**:511–520.

Xiao, H.; Xu, L.H.; Yamada, Y.; Liu, D.X. 2008 "Coronavirus spike protein inhibits host cell translation by interaction with Eif3F" *PloS One* Issue 1. e1494.

Hershey, J.; Merrick, W. (2000) "The pathway and mechanism of initiation of protein synthesis." En: *Translational control of gene expression* (ed. N. Sonenberg et al), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 33-88.

Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICYT) 2007 Los Sectores de Pesca y Acuicultura en Chile. Capacidades de Investigación y áreas de Desarrollo Científico-Tecnológico. (En línea) < <http://www.conicyt.cl> > (Consulta 3 Octubre 2017)

Fay D.S. & Gerow K. - The C. elegans Research Community, WormBook A biologist's guide to statistical thinking and analysis (En línea) <<http://www.wormbook.org>> (Consulta 15 Mayo 2018)

Food and Agriculture Organization Visión general del sector acuícola nacional: Chile

(En Línea) <http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_chile/es#tcN70078>

(Consulta 3 Octubre 2017)

SalmonChile InfoCenter Asociación de la Industria del Salmón de Chile A.G. (En línea)

<<http://www.salmonchile.cl/es/info-center.php>> (Consulta: 2 Octubre 2017)

Servicio Nacional de Aduanas Anuario Estadísticas de Comercio Exterior 2016 (En

Línea)

<<https://www.aduana.cl/anuarios-compendios-y-reportes-estadisticos/aduana/2016-09-20/165452.html>> (Consulta: 1 Octubre 2017)

Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA) Anuario Estadístico de

Pesca 2012 – 2016 (En línea) <<http://www.sernapesca.cl/>> (Consulta: 3 Octubre 2017)

Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA) *Informes Sanitarios*

Salmonicultura en Centros Marinos 2012 - 2015 (En línea) < <http://www.sernapesca.cl/>>

(Consulta: 4 Octubre 2017)