

**UNIVERSIDAD DE CHILE**



**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA POSTGRADO Y POSTÍTULO**

**RESPUESTA INMUNOLÓGICA DE TRUCHA ARCOÍRIS  
(*Oncorhynchus mykiss*) FRENTE A LA ESTIMULACIÓN  
CON LA PROTEÍNA VP1 DEL VIRUS DE LA NECROSIS  
PANCREÁTICA INFECCIOSA: RELEVANCIA DE  
LINFOCITOS TCD4+ TH1 Y TH2**

**AGUSTÍN ALEJANDRO TRUJILLO IMARAI**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias  
y Título profesional de Médico Veterinario**

**Profesor director de tesis: Mónica Imarai Bahamonde  
Co-director: Pedro Smith Schuster**

**Santiago, Chile**

**2017**

## **BIOGRAFÍA**

Agustín Trujillo Imarai nació en la ciudad de Concepción el 9 de agosto el año 1990, hijo de Olegario Trujillo Herrera y Ana Imarai Bahamonde. Sus estudios escolares se realizaron en el Liceo Salesiano San José (1997-2001), Colegio El Salvador (2001-2002) y Colegio Compañía de María Seminario (2003-2008). Posteriormente, el año 2009 ingresa a la carrera de Medicina Veterinaria en la Universidad de Chile, egresando el año 2013. Una vez finalizado los estudios en pregrado, el año 2014 ingresa al programa de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar agradeciendo a mis padres, quienes con su ejemplo de vida me han demostrado que nunca hay que rendirse ante la adversidad.

A mi familia, que siempre me ha entregado todo su cariño y apoyo en los buenos y malos momentos.

A la Dra. Mónica Imarai, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por apoyarme y guiarme en cada uno de mis pasos.

Al Dr. Pedro Smith, quien me apoyó como co-director de esta tesis y que siempre tuvo una buena disposición para guiarme con su experiencia y perspectiva del tema.

A mis profesores correctores Dr. José Pizarro y Dr. Ulises Vergara que aceptaron con mucho entusiasmo ser mis correctores.

A mis compañeros de laboratorio, quienes siempre estuvieron dispuestos a enseñarme todo lo que he aprendido y que llenaron de buenos momentos el ambiente de trabajo.

Al Dr. Kevin Maisey, por ayudarme en mi tesis, resolver mis inquietudes y encaminarme a la solución frente a las problemáticas que se presentaron. También aprovecho de agradecer a las chiquillas del laboratorio de Kevin, que siempre que necesité ayuda, estuvieron ahí para sacarme de apuros.

A Ruth Montero, quien con su disciplina y rigurosidad me encaminó en el inicio de mi tesis.

A la Dra. Beatriz Valenzuela por ayudarme a lo largo de este camino.

Al Dr. Héctor Toledo de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, por permitirme desarrollar parte de mi tesis en su laboratorio.

A mis amigos “los patricios” Maximiliano, Eduardo, Pablo, Daniel, Marcelo, Antonio y Nicolás, quienes me acompañaron durante toda la carrera y cuya amistad se ha mantenido a través de los años, los aprecio y quiero a cada uno de ustedes.

A mis amigas de la universidad, Daniela, Paula, Macarena, Daniella, Pamela, Constanza y Fernanda por siempre sacarme una sonrisa.

A “las ratas” Tomás, Sebastián, Claudio, Rodrigo y Víctor por los grandes momentos de risas y de apoyo, gracias a cada uno de ustedes.

A doña Dominga San Martín, quien en mi infancia formó parte de mi crecimiento y que contribuyó a ser quien soy hoy en día.

A mi pareja Camila Calfío, por apoyarme en esta última etapa de mi tesis, sacar siempre lo mejor de mí y motivarme para ir superándome. Gracias por todo mi amor, te quiero muchísimo.

Finalmente quiero agradecer a don Francisco Gómez Ebensperger (Q.E.P.D), quien fue la persona que me motivó a escoger la medicina veterinaria como mi carrera.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN</b> .....	<b>12</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>13</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>14</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>18</b>
4.1. LINFOCITOS TCD4+ EN MAMÍFEROS.....	18
4.1.1. Linfocitos Th1 .....	18
4.1.2. Linfocito Th2.....	20
4.2. SISTEMA INMUNE DE PECES SALMÓNIDOS .....	21
4.2.1. Caracterización de linfocitos T CD4+ en peces.....	21
4.2.2. Linfocitos T helper en peces.....	22
4.3. RESPUESTA INMUNE FRENTE AL DESAFÍO CON IPNV .....	25
4.3.1. Respuesta contra VP1.....	26
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>28</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>28</b>
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
7.1. PECES.....	29
7.2. TRANSFORMACIÓN DE <i>E. COLI</i> NOVA BLUE .....	29
7.3. TRANSFORMACIÓN DE <i>E. COLI</i> BL21 (DE3).....	31
7.4. INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE VP1R .....	31
7.5. PURIFICACIÓN DE VP1R.....	31
7.6. WESTERN BLOT .....	33
7.7. TRATAMIENTO DE LAS TRUCHAS.....	34
7.8. EXTRACCIÓN DE RNA.....	34

7.10. SÍNTESIS DE CDNA .....	35
7.11. PCR EN TIEMPO REAL.....	35
7.12. AISLAMIENTO DE CÉLULAS DE RIÑÓN ANTERIOR Y BAZO .....	36
7.13. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO .....	36
7.14. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN ANTÍGENO ESPECÍFICA.....	37
7.15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	38
<b>8. RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
8.1. OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA VP1 RECOMBINANTE .....	39
8.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	44
8.3. ANÁLISIS DE POBLACIONES RESPONDEDORAS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO .....	44
8.4. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN ANTÍGENO ESPECÍFICO INMUNIZADOS CON VP1R	48
8.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN LOS PECES TRATADOS .....	51
<b>9. DISCUSIÓN .....</b>	<b>56</b>
<b>10. CONCLUSIONES .....</b>	<b>62</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>63</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores para qRT-PCR y PCR de colonias.....	30
---------------------------------------------------------	----

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de PCR de colonias realizado en <i>E. coli</i> Nova Blue transformadas con el vector pET21a/VP1.....	40
Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa del vector pET21a/VP1 aislado de una <i>E. coli</i> NovaBlue transformante.....	41
Figura 3. Extractos totales de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) separados por SDS-PAGE..	42
Figura 4. Análisis de la proteína recombinante purificada mediante Western Blot.....	43
Figura 5. Poblaciones de linfocitos T CD4+IgM- de riñón por citometría de flujo. .....	46
Figura 6. Poblaciones de linfocitos T CD4+IgM- de bazo por citometría de flujo. .....	47
Figura 7. Proliferación antígeno-específica de células de riñón de trucha arcoíris con diferentes tratamientos.....	49
Figura 8. Proliferación antígeno-específica de esplenocitos de trucha arcoíris con diferentes tratamientos.....	50
Figura 9. Niveles de transcritos de genes marcadores de respuesta Th1 en el riñón de truchas arcoíris..	52
Figura 10. Niveles de transcritos de genes marcadores de respuesta Th1 en el bazo de truchas arcoíris.....	53
Figura 11. Niveles de transcritos de genes marcadores de respuesta Th2 en el riñón de truchas arcoíris..	54
Figura 12. Niveles de transcritos de genes marcadores de respuesta Th2 en el bazo de Truchas arcoíris. ....	55

## RESUMEN

La necrosis pancreática infecciosa es una enfermedad que afecta principalmente a los peces salmónidos, generando un impacto a nivel mundial por las mortalidades y las pérdidas económicas. El agente responsable de esta enfermedad es un virus RNA doble hebra que posee dos segmentos; el segmento A que codifica para una poliproteína que posteriormente a origen a las proteínas de la cápside viral VP2 y VP3. El segmento B codifica para la proteína VP1, que es un RNA polimerasa RNA dependiente. El alto peso molecular de VP1 sugiere que esta podría ser una proteína altamente inmunogénica y por lo tanto un buen candidato para el diseño de vacunas recombinantes.

Con el objetivo de evaluar sus propiedades inmunogénicas, VP1 fue expresada en *Escherichia coli*, utilizando el vector de expresión pET21a/VP1, y purificada bajo condiciones desnaturalantes. Se inmunizaron truchas arcoíris con VP1 y se analizó la respuesta linfocitaria, a través de ensayos de proliferación y análisis de transcritos mediante qRT-PCR.

VP1r indujo un aumento en la expresión transcripcional de IFN $\gamma$ , IL-12, T-bet e IL-4/13 A de los órganos linfoides de la trucha, además indujo proliferación en ensayos de re-estimulación *in vitro*. Estos resultados sugieren que VP1r es una proteína que induce una respuesta linfocitaria tipo Th1 y Th2.



## SUMMARY

Infectious pancreatic necrosis is a disease that mainly affects salmonid fish, generating a global impact due to mortalities and economic losses. The agent responsible for this disease is a double-stranded RNA virus that has two segments; segment A that codes for a polyprotein that subsequently originates the viral capsid proteins VP2 and VP3. Segment B encodes VP1 protein, which is an RNA-dependent RNA polymerase. The high molecular weight of VP1 suggests that this could be a highly immunogenic protein and therefore a good candidate for the design of recombinant vaccines.

In order to evaluate its immunogenic properties, VP1r was expressed in *Escherichia coli*, using the expression vector pET21a / VP1, and purified under denaturing conditions. Rainbow trout were immunized with VP1r and the lymphocyte response was analyzed, through proliferation assays and transcript analysis by qRT-PCR.

VP1r induced an increase in the transcriptional expression of IFN $\gamma$ , IL-12, T-bet and IL-4/13 A of the lymphoid organs of the trout, and induced proliferation *in vitro* re-stimulation assays. These results suggest that VP1r is a protein that induces a Th1 and Th2 type lymphocyte response.

# 1. Introducción

La Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) es una enfermedad sistémica, aguda y contagiosa que afecta a varias especies de salmónidos, y que es responsable de importantes pérdidas económicas para la industria acuícola mundial. El agente etiológico de esta enfermedad es el Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) perteneciente al género *Aquabirnavirus* y a la familia *Birnaviridae* (Hill *et al.*, 1995), cuya familia además alberga al Virus de la Enfermedad Bursal Infecciosa (IBDV) y al Virus X de la *Drosophila* (IDXV).

Este virus no solo se ha detectado en salmónidos sino también en otros peces como barracuda (*Sphyraenas phyraena*), aligote (*Pagellus acarne*), ojarra (*Diplodus vulgaris*), breca (*Pagellus erythrinus*), raspallón senegalés (*Diplodus bellotii*) y salmonete de roca (*Mullussur muletus*) (Moreno *et al.*, 2014), además se ha aislado desde crustáceos y moluscos (Davies *et al.*, 2010). Los animales que sobreviven a la exposición pasan a ser portadores de la enfermedad, perpetuando de esta manera el riesgo de infección y generando un riesgo tanto para la salmonicultura como para el medio ambiente (Ortega y Enríquez, 2007; Reyes-Cerpa *et al.*, 2014).

Actualmente se conocen dos serogrupos en los birnavirus acuáticos, el A y el B. IPNV pertenece al serogrupo A, el cual alberga 9 serotipos (De A1 hasta A9); West Buxton (USA), Sp (Dinamarca), Ab (Dinamarca), He (Alemania), Te (Reino Unido), Can 1, 2 y 3 (Canadá) y Jasper (Canadá) (Hill y Way, 1995).

IPNV posee una cápside icosaédrica, sin envoltura de aproximadamente 60 nm de diámetro, en cuyo interior se encuentra el genoma viral compuesto por dos segmentos de RNA doble hebra (dsRNA) denominados A y B (Dobos, 1995). El segmento A (3,2 kb) consiste en dos marcos de lectura abiertos (ORF); el ORF1 codifica para una pequeña proteína no estructural denominada VP5 de 17 kDa, que tiene un efecto antiapoptótico; el ORF2 codifica para una poliproteína de

106 kDa que es cotraduccionalmente procesada por la proteasa viral VP4 generando 3 productos; pVP2, precursor de la proteína estructural VP2, que forma la cápside proteica mayor y es considerada una proteína antigénica (Salgado-Miranda *et al*, 2014), VP4 es una proteína no estructural con actividad proteasa, y VP3, una proteína estructural menor con epitopos neutralizantes específicos (Macdonald y Dobos, 1981; Duncan *et al.*, 1987; Santi *et al.*, 2005). El segmento B (2,9 kb), posee solo un ORF que codifica para la proteína VP1 de 94 kDa correspondiente a una RNA polimerasa RNA dependiente que está implicada en la síntesis de RNA viral. La proteína VP1 puede estar presente de 2 formas: como polipéptido libre o también como una proteína unida al genoma (VPg) (Scott *et al.*, 1997). VP1 es una proteína de localización interna en el virión, la cual se produce en un número de copias menor respecto a las otras proteínas virales. La traducción de VP1 comienza en el primer codón de metionina del ORF del segmento B, produciendo un polipéptido de 845 aminoácidos para el serotipo Jasper y 844 aminoácidos para la variante Sp (Serotipo A2). La composición aminoacídica de los distintos tipos de VP1 de la familia birnaviridae son similares entre sí, sin embargo, la única característica inusual es el bajo contenido de cisteínas (3 en el caso de IPNV y 8 en el caso de IBDV). El serotipo Jasper tiene 8 potenciales sitios de N-glicosilaciones, 5 de los cuales son conservados en el serotipo Sp y 2 en IBDV. Las secuencias del serotipo Sp e IBDV contiene otro sitio potencial de N-glicosilación que no se ha encontrado en el serotipo Jasper (Duncan *et al*, 1991). Existe una alta homología (81%) de la secuencia de VP1 entre el serotipo Jasper (Canada), pero solo un 41% con la proteína VP1 de IBDV (Dobos, 1995). Contraria a otras RNA polimerasas dependientes de RNA, la proteína VP1 de IPNV carece de la secuencia conservada de Glicina-Asparragina-Asparragina, correspondiente al sitio catalítico clásico propuesto para las enzimas de esta familia (Shwed *et al*, 2002).

Actualmente, los resultados de estudios sugieren que el ingreso del virus a la célula podría ser mediante macropinocitosis (Levican *et al.*, 2017). Luego de su ingreso, se detecta el RNA mensajero (mRNA) al cabo de 2 h post infección (hpi), luego a las 4-6 hpi comienza la síntesis de proteínas virales y a las 8-10 hpi se inicia la replicación del RNA genómico viral (Dobos, 1977; Somogyi y Dobos., 1980), cuyo peak de síntesis se alcanza entre las 8 y 10 hpi (Dobos, 1995).

El cuadro clínico patológico se caracteriza por mortalidad súbita y elevada, natación lenta y errática, hiperpigmentación cutánea (piel oscura; debido a hormonas estimuladoras de melanóforos), severa distensión abdominal (atribuida a la necrosis del páncreas exocrino, intestino anterior e hígado), dilatación del estómago y ascitis, presencia de pseudofecas, exoftalmia y branquias pálidas. La presencia de pseudofecas es atribuible a la enteritis catarral aguda derivada de la necrosis y desprendimiento del epitelio intestinal, provocado por la replicación de IPNV en células del epitelio intestinal (Vega *et al.*, 2011). En la necropsia, la cavidad celómica suele presentar ascitis, el páncreas y la grasa abdominal presenta petequias multifocales y los órganos internos muestran coloración pálida (Vega *et al.*, 2011).

La transmisión horizontal de agentes patógenos de un organismo a otro como IPNV es más efectiva en condiciones de cultivo que en forma natural debido al manejo de un gran número de peces en volúmenes de agua reducido. Esto hace que sea muy importante tener vacunas que sean efectivas para prevenir la presentación de las enfermedades. Los principales agentes infecciosos involucrados en las pérdidas en el rubro de la acuicultura chilena son *Piscirickettsia salmonis* e IPNV, siendo esta última la segunda enfermedad más importante. Esta enfermedad produce pérdidas que son cercanas a los US \$ 200 millones de dólares anuales en Chile (Fraunhofer, 2014). Las vacunas de origen viral, en su gran mayoría ocupan el virus inactivado o subunidades proteicas recombinantes (Somerset *et al.*, 2005). Por ejemplo, Centrovet

ofrece una vacuna inyectable (Blueguard® SRS+IPN+Vo) que otorga protección contra IPNV utilizando el virus inactivado cepa SP y otra que se administra mediante inmersión (Blueguard® IPN) que contiene las cepas Sp y WB de IPNV. Por su parte Veterquímica ofrece una vacuna inyectable (IPE-VAC® microdosis) y una versión de la misma vacuna pero administrable por inmersión, ambas versiones incluyen las cepas Sp y WB de IPNV. Todas las vacunas presentadas anteriormente utilizan el virus inactivado en la preparación de la vacuna, pero también existen otras como las que ofrece Intervet (AQUAVAC SARISTIN), las cuales utilizan la proteína recombinante VP2 de IPNV.

El empleo de vacunas destinadas a la salmonicultura crece cada año, y a pesar de que el número de casos de peces infectados ha disminuido, siguen reportándose casos de diversas enfermedades infecciosas. En el caso de IPNV, se requiere caracterizar más profundamente el tipo de respuesta que se genera frente al virus e idealmente, se debiera conocer las características de la respuesta que resulta protectora frente a IPNV. Con este conocimiento se podría proyectar mejoras en las vacunas actuales, teniendo en consideración los mecanismos de respuesta inmunológica por parte de estos peces.

En esta tesis se busca avanzar hacia estos objetivos, abordando la caracterización de la respuesta inmunológica de los peces salmónidos frente a un antígeno viral en particular, la proteína VP1. Esta es la proteína de mayor tamaño de IPNV por lo que debiera ser más inmunogénica que VP2 que es usada en las vacunas recombinantes; en relación a esta última se ha visto que es capaz de inducir la producción de anticuerpos. Al respecto, Munang'andu *et al.*,( 2013b), probaron distintas variantes de la proteína VP2, teniendo éxito incluso en la neutralización viral. Sin embargo en terreno el éxito de la vacunación ha sido cuestionado ya que los brotes siguen apareciendo (SERNAPESCA, 2016).

## **2. Revisión bibliográfica**

### **2.1. Linfocitos TCD4+ en mamíferos**

Los linfocitos TCD4+ son células de la respuesta inmune adaptativa, las cuales se originan a partir de precursores de la médula ósea, que posteriormente sufren un proceso de maduración que tiene lugar en el timo, donde pasan por un proceso de selección negativa y positiva (Klein *et al.*, 2014). Luego sufren un proceso de diferenciación en los cuales son fundamentales el reconocimiento de antígenos unidos a las células presentadoras y las citoquinas polarizantes que determinarán las subpoblaciones de linfocitos TCD4+ que se generarán. Las subpoblaciones generadas se caracterizan principalmente por producir citoquinas y factores de transcripción que los caracterizan, pudiendo discriminarse 4 principales; Th1 que se encarga de responder frente a bacterias intracelulares y virus, Th2 que cumplen una función humoral y es importante en la inmunidad contra parásitos helmínticos, Th17 que tiene relevancia en la respuesta inflamatoria y Treg, que es una subpoblación más bien especializada en la inmunosupresión para mantener la homeostasis y favorecer la tolerancia hacia antígenos propios (Zhu *et al.*, 2010)

#### **2.1.1. Linfocitos Th1**

Esta subpoblación es responsable de generar una respuesta microorganismos como bacterias intracelulares y virus. Su diferenciación está marcada por las citoquinas IL-12, IL-18 e IFN $\gamma$ . La regulación de la expresión de los genes para las citoquinas características de los linfocitos Th1 está determinada por el factor de transcripción T-bet.

## **T-bet**

T-bet es el factor de transcripción más característico de los linfocitos Th1, ya que se ha demostrado que en presencia de esta proteína, los linfocitos T CD4+ son capaces de aumentar la expresión de IFN $\gamma$  y reducir los niveles de IL-4 e IL-5. También es capaz de inducir la expresión de IL-12R $\beta$ 2 (Szabo *et al.*, 2000).

## **IFN $\gamma$**

IFN $\gamma$  es un citoquina efectora responsable de activar a los macrófagos, permitiendo que estos sintetizen intermediarios reactivos del oxígeno y del óxido nítrico, así como de enzimas lisosómicas. Éstos son potentes microbicidas que son sintetizados dentro de los lisosomas de los macrófagos (Gordon, 2002); IFN $\gamma$  también regula el incremento la expresión de MHC clase II y la secreción de IL-12 que promueve la diferenciación hacia Th1. Por último, la secreción de IFN $\gamma$  promueve la diferenciación de células T citotóxicas desde sus precursoras CD8+ al activar células dendríticas que unen a células Tc vírgenes. El conjunto de estos efectos combinados hacen que el subtipo Th1 sea en particular idóneo para respuestas protectoras frente a infecciones virales y otros agentes patógenos intracelulares (Billiau y Matthys, 2009).

## **IL-12**

IL-12 es una citoquina heterodimérica que se compone de las subunidades p35 y p40, la cual es producida por las células dendríticas después de un encuentro con agentes patógenos. Esta citoquina actúa como un factor de crecimiento de linfocitos T activados, promoviendo la producción de IFN $\gamma$  (Murray *et al.*, 1994). IL-12 ha demostrado ser una citoquina además protectora de los linfocitos Th1, ya que inhibe la apoptosis inducida por antígenos (Liew, 2002).

### **2.1.2. Linfocito Th2**

La diferenciación de la subpoblación Th2, a diferencia del Th1 es inducida por la citoquina polarizante IL-4. Su función principal es la de generar una respuesta de tipo humoral y generar una respuesta contra parásitos helmínticos (Paul y Zhu, 2010).

#### **GATA-3**

Este factor de transcripción es fundamental en la diferenciación de los linfocitos T CD4+ hacia el fenotipo Th2, el cual es capaz de inducir la expresión de IL-4 y de otras citoquinas características de Th2 (Zheng y Flavell, 1997).

#### **IL-4**

IL-4 es una citoquina responsable de desencadenar una cascada de señalización que induce la expresión del factor de transcripción GATA-3, que a su vez regula la expresión de citoquinas específicas para Th2, entre ellas IL-4, IL-5, IL-13 (Pernis y Rothman, 2002). Las citoquinas producidas por la población Th2 ayuda a eliminar infecciones parasitarias extracelulares, incluso las causadas por helmintos. IL-4 actúa sobre distintos tipos celulares, por ejemplo en los macrófagos aumenta la expresión de moléculas MHC II e inhibe la producción de óxido nítrico (Oswald *et al.*, 1992), en los linfocitos B promueve su proliferación y switch de isotipo hacia IgE, IgG4 (en humano) (Gascan *et al.*, 1991) e IgG1 (en ratón) (Vitetta *et al.*, 1985; Coffman *et al.*, 1986), y en los eosinófilos su activación, diferenciación y migración (Sanderson *et al.*, 1986).

#### **IL-13**

IL-13, al igual que la IL-4 es capaz de activar macrófagos expresen receptores de manosa y enzimas que favorecen la síntesis de colágeno y fibrosis (activación alternativa de los macrófagos) (Gordon, 2002). Tanto IL-4 como IL-



13 cumplen funciones bastante similares, sin embargo IL-4 es una citoquina mucho más activa en la regulación del desarrollo de la respuesta Th2, mientras que IL-13 está más focalizada en la hipersensibilidad de las vías aéreas, en la secreción de mucus y la inflamación en intestino producto de la respuesta tipo Th2

## **IL-5**

La IL-5 es una citoquina homodimérica que es capaz de inducir aumento en el número de eosinófilos, aumenta el número de moléculas de adhesión, y también puede inducir “switch” de isotipo en linfocitos B hacia subclases de IgG que no activan la vía del complemento (Lopez *et al.*, 1986).

## **2.2. Sistema inmune de peces salmónidos**

### **2.2.1. Caracterización de linfocitos T CD4+ en peces**

Con las herramientas actuales se ha podido describir linfocitos TCD4+ en peces salmónidos. Recientemente nuestro grupo de investigación realizó la caracterización de linfocitos T CD4+ en bazo de trucha arcoíris. Para verificar la presencia de células T CD4+, se utilizaron anticuerpos específicos contra CD4 y CD3ε, así como también la medición de citoquinas y factores de transcripción. Los resultados obtenidos en bazo, muestran que hubo proliferación antígeno-específica de linfocitos T CD4+ mediante un ensayo de incorporación de timidina tritiada y diferenciación, que se evidenció con la expresión de citoquinas IL-4/13, IL-15, IL17D e IFN $\gamma$  y de factores de expresión como T-*bet*, GATA3 y STAT-1. Los resultados de los análisis de leucocitos aislados de bazo y riñón mediante citometría de flujo mostraron que alrededor del 21% y 34,5 % de la población celular aislada, respectivamente, fueron linfocitos TCD4+CD3+ (Maisey *et al.*, 2016).

### 2.2.2. Linfocitos T helper en peces

Se han logrado describir en peces diferentes genes relacionados tanto con la respuesta Th1 como con la Th2, los cuales que tendrían funciones similares a la de vertebrados superiores.

#### IFN $\gamma$

El gen de IFN $\gamma$  ha sido identificado por análisis de la sintenia en el genoma de fugu (Zou *et al.*, 2004). Por otro lado el gen que codificada para IFN $\gamma$  ha sido secuenciado en trucha arcoíris (Zou *et al.*, 2005), pez cebrá (*Danio rerio*) (Igawa *et al.*, 2006), salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Robertsen, 2006), pez gato americano (*Ictalurus punctatus*) (Milev-Milovanovic *et al.*, 2006) y, carpa común (*Cyprinus carpio*) (Stolte *et al.*, 2008) entre otras especies. A pesar de la divergencia, la organización del gen de IFN $\gamma$  en peces teleósteos es bastante conservada (Zou *et al.*, 2005; Igawa *et al.*, 2006). Se ha reportado que en especies como el salmón del Atlántico, carpa común, pez gato americano y trucha arcoíris existen dos copias de IFN $\gamma$  (Zou y Secombes, 2011).

Hoy en día se han logrado producir IFN $\gamma$  recombinante con bioactividad probada. Por ejemplo, se ha observado que cuando se estimulan macrófagos de trucha con rIFN $\gamma$ , éstos exhiben un importante aumento de transcritos asociados a MHC-I y MHC-II, lo que sugiere que IFN $\gamma$  juega un rol importante en el aumento de la presentación de antígenos (Zou *et al.*, 2005; Igawa *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2007). Estudios realizados en leucocitos de riñón anterior de trucha, carpa común y pez dorado mostraron una alta actividad respiratoria cuando estos son incubados con rIFN $\gamma$  y la estimulación de macrófagos con rIFN $\gamma$  lleva al incremento en la expresión de genes relacionados con la enzima óxido nítrico sintasa inducible y al incremento en la liberación de óxido nítrico (Grayfer *et al.*, 2010), similar a lo que ocurre en vertebrados superiores.

## **IL-12**

La IL-12 también se ha descrito en peces, reportándose la de expresión de varias isoformas para p40 y p35 (Wang *et al.*, 2014). La expresión de la subunidad p35 ha mostrado aumento frente a la estimulación *in vivo* con poli I:C (Yoshiura *et al.*, 2003) e infecciones virales, sugiriendo un efecto antiviral.

## **TNF $\alpha$**

En peces TNF $\alpha$  se ha clonado desde diferentes especies, como la trucha arcoíris (Laing *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 2002), carpa común (Saeji *et al.*, 2003; Savan y Sakai, 2004), pez cebra (Savan *et al.*, 2005) y turbot (*Scophthalmus maximus*) (Ordas *et al.*, 2007). El árbol filogenético y el análisis de la sintenia sugiere que existen dos tipos de TNF $\alpha$  en peces teleósteos (Wang y Secombes, 2013). Los estudios relacionados con esta citoquina han mostrado resultados contradictorios, ya que por un lado, en algunas especies de peces se encontró que difícilmente rTNF $\alpha$  es capaz de activar fagocitos (macrófagos) (Roca *et al.*, 2008; Forlenza *et al.*, 2009), mientras que estudios hechos en trucha arcoíris y pez dorado mostraron que tanto rTNF $\alpha$ 1 como la 2 mostraron ser activas en macrófagos (Zou *et al.*, 2003; Grayfer *et al.*, 2007).

## **T-bet**

El factor de transcripción T-bet, se ha logrado clonar desde trucha arcoíris (Wang *et al.*, 2010), pez cebra (Mittra *et al.*, 2010), carpa herbívora (Wang *et al.*, 2012) y carpa cruciana (Wang *et al.*, 2010). La expresión de los genes de este factor de transcripción ha mostrado ser alta en sangre periférica, riñón anterior y bazo (Wang *et al.*, 2010; Takizawa *et al.*, 2008a). En trucha se ha observado que existe una sobre expresión en esplenocitos cuando los linfocitos son estimulados con fitohemoaglutinina (PHA) (Wang *et al.*, 2010) lo que sugiere la presencia de linfocitos Th1 respondedores en la trucha.

## **IL-4/13**

Las investigaciones actuales que tienen relación con genes asociados al subtipo Th2 en peces, han reportado genes que cumplen tanto funciones de la IL-4 como de la IL-13 de mamíferos, siendo denominada IL-4/13 A y B (Ohtani *et al.*, 2008). Los estudios funcionales de esta citoquina se han realizado tanto en trucha arcoíris como en pez cebra. Por ejemplo, la inyección de rIL-4/13A incrementa la expresión de DC-SIGN (CD209, marcador de células dendríticas) (Lin *et al.*, 2009). En presencia de rIL-4/13A se han registrado aumentos en el porcentaje de células IgZ+ en sangre periférica de pez cebra (Hu *et al.*, 2010). En trucha arcoíris rIL-4/13A y B han mostrado modular la expresión de numerosos genes *in vitro*, sin embargo el efecto sobre las isoformas de las inmunoglobulinas aún no está claro (Wang y Secombes, 2013). Todas estas funciones son semejantes a las descritas para IL-4 e IL-13 en vertebrados superiores (Paul y Zhu, 2010).

## **GATA-3**

GATA-3 ha sido identificado en pez cebra (Neave *et al.*, 1995; Read *et al.*, 1998), carpa cruciana (Takizawa *et al.*, 2008b), peces salmónidos (Wang *et al.*, 2010; Kumari *et al.*, 2009), carpa herbívora (Wang *et al.*, 2012) y bacalao del Atlántico (Chi *et al.*, 2012). En este último estudio se observó que la expresión del transcrito de GATA-3 se expresó en varios tejidos, siendo los más importantes el riñón anterior, bazo y branquias. En otros estudios realizados en trucha mostraron que frente a una infección con *Y. ruckeri* se registró una disminución en la expresión de GATA-3 y T-bet, sugiriendo que existe algún mecanismo de evasión por parte del agente patógeno para suprimir la respuesta inmune del hospedero (Wang *et al.*, 2010).

### **2.3. Respuesta inmune frente al desafío con IPNV**

Aunque no hay estudios sistemáticos de las características de la respuesta inmune de los peces frente a la infección por IPNV, existen algunos estudios que reportan variados tipos de respuesta por parte de las especies salmónidas como por ejemplo algunos estudios en donde se ha analizado la respuesta humoral reflejada en la producción de anticuerpos específicos contra el virus (Frost y Nest, 1997; Dadar *et al.*, 2015).

Rivas-Aravena *et al.*, (2012) desafiaron truchas arcoíris con IPNV y con una partícula viral inmadura (provirus), evidenciándose un aumento tanto de inmunoglobulinas como de actividad citotóxica no específica al día 10, que posteriormente comienza a decrecer al día 15 y 21.

Munang'andu *et al.*, (2013) realizaron un estudio para indagar cual es la relevancia de linfocitos TCD4+ y TCD8+ cuando los peces están infectados con el virus, para ello inmunizaron salmones del Atlántico con una cepa recombinante de IPNV, al día 56 post inmunización se les desafió a una infección con IPNV mediante cohabitación con una cepa noruega altamente virulenta, luego de este desafío se hicieron muestreos de riñón y bazo al día 0, 7 y 21 post desafío. Los mayores cambios se observaron entre el día 0 y 21, donde cabe destacar que hubo un aumento en la expresión de genes asociados a CD8 $\alpha$  y granzima A, los cuales son marcadores de linfocitos TCD8+. Los resultados obtenidos sugieren que bajo estas condiciones experimentales cuando se infecta con IPNV, se logra expresar marcadores relacionados con linfocitos T CD8+, y que de alguna manera también se asocia con la respuesta tipo Th1 de los linfocitos T CD4+.

Reyes-Cerpa *et al.*, (2014) quisieron indagar cómo se comportan ciertas citoquinas de la respuesta inmune adaptativa como son IFN- $\gamma$  e IL-12; ambos marcadores para el subtipo Th1, para ello desafiaron a truchas arcoíris a una infección de IPNV mediante inmersión, en este experimento se puede

discriminar dos grupos principalmente; aquellos que presentaron signología clínica y los que soportaron el desafío, y que posteriormente se convirtieron en portadores del virus. Los resultados obtenidos mediante RT-PCR en tiempo real, muestran un aumento significativo de la expresión de IFN $\gamma$  en la mayoría de los grupos, para el caso de IL-12 se observó un aumento solo en el grupo de peces asintomáticos luego de la infección. Por lo tanto, estas condiciones experimentales también muestran que luego de la infección con el virus se observa una respuesta tipo Th1, reflejado en la expresión tanto de IFN- $\gamma$  como de IL-12.

### **2.3.1. Respuesta contra VP1**

La preparación de las actuales vacunas presentes en el mercado para evitar la aparición de brotes de IPN, contienen VP2 recombinantes como antígeno (Intervet), ya que es una proteína que se encuentra en la parte externa de la cápside viral y se ha mostrado que bajo condiciones de laboratorio los peces inmunizados con esta proteína son capaces de inducir una respuesta humoral (Dadar *et al.*, 2015; Frost y Ness, 1997; Ballesteros *et al.*, 2012). Sin embargo la respuesta protectora contra las infecciones virales debiera involucrar la activación de una respuesta Th1 y activación de linfocitos TCD8 (Billiau y Matthys, 2009). En consecuencia resulta interesante poder estudiar las propiedades inmunogénicas de la proteína VP1 de este virus. Debido a su alto peso molecular (94 kD), consideramos que VP1 debiera ser una proteína altamente inmunogénica, por el mayor número de epítomos que las células presentadoras de antígeno pueden potencialmente mostrar a los linfocitos T. VP2 ha sido la proteína viral más estudiada para el uso de vacunas, pensando en obtener una respuesta de tipo humoral con anticuerpos neutralizantes. Desde este punto de vista, VP1 no ha sido estudiada por ser una proteína que se ubica al interior del virión. Respecto a lo anterior, no existen trabajos

disponibles relacionados con la respuesta inmune frente a esta proteína, lo que significa que es aún más importante indagar que sucede cuando esta es inyectada en peces salmónidos. Sin embargo, recientemente Lauksund *et al.*, (2015), realizó un estudio para determinar si el virus IPNV producía proteína que antagonizaran la expresión de IFN de tipo I, el cual es una citoquina antiviral de la respuesta inmune innata (Crouse *et al.*, 2015). Utilizando un plásmido con el gen de la luciferasa como reportero, bajo el control del promotor de IFN $\alpha$ 1, se cotransfectaron células TO con este plásmido y plásmidos que expresaban distintas proteínas de IPNV (VP1, preVP2, VP3, VP4 y VP5). Los resultados mostraron que todas las proteínas, excepto VP1 inhibieron la activación de IFN mediada por IPS-1. Por el contrario VP1 por sí sola indujo la activación de IFN $\alpha$ . Esto es interesante por cuanto muestra las particularidades que posee esta proteína de IPNV.

En esta tesis nos hemos propuesto indagar sobre el tipo de respuesta T helper que VP1 puede inducir en la trucha arcoíris. Dado que en las primeras fases de activación se espera que ocurra la diferenciación de la respuesta mediada por linfocitos T CD4+ o T helper. Se determinará si la respuesta inducida por VP1 es de tipo Th1 y/o Th2.

### **3. Hipótesis**

En trucha arcoíris la proteína VP1 recombinante (VP1r) de IPNV induce una respuesta tipo Th1 y/o Th2.

### **4. Objetivos**

#### **Objetivo general**

Determinar el tipo de respuesta que los linfocitos T CD4+ de trucha arcoíris producen frente a la estimulación con la proteína VP1r de IPNV.

#### **Objetivos específicos**

1. Evaluar el desarrollo de la inmunidad a través del aumento en el porcentaje de linfocitos T CD4 en los diferentes órganos linfoides de truchas arcoíris tratadas con VP1r.
2. Determinar el efecto de VP1r sobre la proliferación de los linfocitos T en trucha arcoíris.
3. Evaluar el perfil de expresión del mRNA de citoquinas tipo Th1 y Th2 en la respuesta de la trucha arcoíris frente a VP1r.



## 5. Materiales y métodos

### 5.1. Peces

Truchas arcoíris (*Onchorynchus mykiss*) de 40-50 gr fueron obtenidas desde centros de cultivo locales, las cuales estaban libres de patógenos. Los peces se mantuvieron en la Unidad Experimental de peces del Centro de Biotecnología Acuícola de la Universidad de Santiago de Chile, con recambio de agua constante, aporte de aire y a una temperatura de 16°C. Las truchas fueron alimentadas con dieta comercial (Ewos, Chile) y además fueron aclimatadas una semana antes de los experimentos.

### 5.2. Transformación de *E.coli* Nova Blue

Para la transformación se ocupó el plásmido pET21a/VP1 recombinante, que contiene la secuencia codificante para VP1 (Graham *et al.*, 2011). Las bacterias *E. coli* Nova blue (Merk, San Diego, USA) fueron incubadas en hielo por 30 min con 50 ng de pET21a/VP1. Luego las bacterias fueron sometidas a un shock térmico a 42°C por 30 seg y colocadas en hielo por 2 min. Después se realizó incubación de estas a 37°C por una h y 30 min con agitación constante. Terminada la incubación se sembraron placas con medio LB Broth (Miller) (Tryptona 10 g/L, NaCl 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L) sólido con ampicilina (100 µg/µL) y se dejaron a 37°C durante toda la noche sin agitación (Green y Sambrook, 2001).

De las colonias crecidas se seleccionaron algunas y se realizó PCR de colonias con partidores específicos para la secuencia de VP1 (Tabla 1). Las condiciones para el PCR fueron: 94°C por 4 min de desnaturalización inicial, 35 ciclos de

94°C por 40 seg, 54°C por 45 seg, 72°C por 45 seg y una elongación final a 72°C por 5 min (Oyarzún, 2014). De las colonias que expresaron el plásmido se seleccionó una para realizar extracción de plásmido con el kit Favor Prep endotoxin-free plasmid extraction midi kit (Favorgen, Taiwan) siguiendo el protocolo sugerido por el proveedor.

Gen	Secuencia(Fw/Rv) (5' – 3')	Tamaño (pb)	TM (°C)	Eficiencia	ID genbank
EF1 $\alpha$	CAAGCATATCCGTCGTGGCA	327	57,1	2,05	NM_001124339.1
	ACAGCGAAACGACCAAGAGG		57,6		
IFN $\gamma$	CCGTACACCGATTGAGGACT	133	56,5	2,082	NM_001124620.1
	GCGGCATTACTCCATCCTAA		54,6		
IL-12	GAGCCAAGTCTTATGGCTGC	159	56,9	2,082	NM_001124392.1
	GTTCAAACCTCCAACCCTCCA		55		
T-bet	GGTAACATGCCAGGGAACAGGA	317	59,2	2,09	NM_001195793.1
	TGGTCTATTTTTAGCTGGGTGATGTCTG		58,4		
IL4/13A	GTCAGAGGAACTTCTGGAAACA	166	54,5	1,93	NM_001246341.1
	GTTGTAAACCCTCAGATGTCG		53,3		
GATA3	CCAAAAACAAGGTCATGTTTCAGAAGG	313	56,7	2,09	NM_001195792.1
	TGGTGAGAGGTTCGGTTGATATTGTG		58,5		
VP1	TCGGACATCTTCAACTCACCA	1910	59,03		M58756.1
	TTGTGCGAGGGACATGTGTTT		57,37		

**Tabla 1. Partidores para qRT-PCR y PCR de colonias.**

### **5.3. Transformación de *E.coli* BL21 (DE3)**

Bacterias *E. coli* BL21 (DE3) (Merk) se transformaron con 50 ng del plásmido pET21a/VP1 en las mismas condiciones descritas en el punto anterior. La presencia del inserto se verificó también mediante PCR en algunas colonias, seleccionándose 2 clones transformantes para comprobar la inducción de VP1r por la adición de isopropil- $\beta$ -D-1 tiogalactopiranosido (IPTG).

### **5.4. Inducción de la expresión de VP1r**

El clon seleccionado se creció en medio LB con ampicilina (100 $\mu$ g/ $\mu$ L) en un volumen de 3 mL por 16 h a 37°C. Posteriormente se traspasó una fracción de este cultivo (150  $\mu$ L) un nuevo volumen de 3 mL de LB y se creció a 37°C hasta alcanzar una D.O de 0,6. Luego, se tomaron dos volúmenes de cultivo de 1 mL; uno para adicionar IPTG a una concentración final 1mM y el segundo como control no inducido. Las muestras fueron incubadas a 30°C por 3 h con agitación. Después de la inducción, ambas muestras se centrifugaron a 900 x g por 5 min y el pellet se resuspendió en “buffer” de carga de proteínas 6x (Tris-HCl pH 8, SDS 10 %, Glicerol 30%,  $\beta$ -mercaptoetanol 8 %, azul de bromofenol). Las muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE al 10%. Los clones de bacterias transformantes que expresan VP1r por estimulación con IPTG fueron mantenidos a -80°C en glicerol al 20%.

### **5.5. Purificación de VP1r**

Para purificar VP1r, uno de los clones seleccionados fue cultivado en 100 mL de medio LB con ampicilina por 16 h a 37°C con agitación constante.

Posteriormente, se centrifugó a  $1.057 \times g$  por 5 min, se resuspendió el pellet en 1 mL de LB, se traspasó a 1 L de LB y se creció hasta una D.O de 0,6 a 37°C con agitación. Una vez obtenida la densidad óptica se extrajo una alícuota que se mantuvo como control, se adicionó IPTG a una concentración final 1mM y cultivando con agitación a 30°C 3h. Luego, las bacterias se recuperaron por centrifugación a  $6.000 \times g$  por 30 min a 4°C, se descartó el sobrenadante. El pellet resultante se usó para la purificación o se almacenó a -80°C hasta su uso.

Para purificar la proteína recombinante, se utilizó un método de purificación en condiciones desnaturantes (Maisey *et al.*, 2016). El pellet se resuspendió en un "buffer" de solubilización (Nonidet P-40 0,0001%, NaCl 300 mM, NaHPO<sub>4</sub> 50 mM, imidazol 10 mM, inhibidor de proteasas) y se sonicó a 4°C con 10 pulsos de 15 seg a 12 W. La muestra se centrifugó a 6000g por una h a 4°C, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en "buffer" 1 (Nonidet P-40 0,0001%, NaCl 1M, NaHPO<sub>4</sub> 50 mM, imidazol 25 mM, glicerol 20%). Luego, la muestra se centrifugó a 6.000 g a 4°C por 15 min y se descartó el sobrenadante. El mismo proceso se realizó con el "buffer" 2 (TRIS 50 mM, beta-mercaptoetanol 20,4 mM, tritón x-100 0,1%, deoxicolato sódico 1,2 mM, glicerol 5%, EDTA 500 µM) y el "buffer" 3 (TRIS 50mM, beta-mercaptoetanol 20 mM, glicerol 5%). Finalmente el pellet se resuspendió en 5 mL de "buffer" denaturante (TRIS 50 mM, beta-mercaptoetanol 20 mM, glicerol 5%, cloruro de guanidinio 6M) y se incubó a 4°C por 16 h sin agitación.

El sobrenadante del pellet incubado fue recuperado y se realizaron diálisis con: cloruro de guanidinio 3 M + TRIS 50 mM p.H 8 (2 h a 4°C), cloruro de guanidinio 2 M + TRIS 50 mM p.H 8 (1 h a 4°C), cloruro de guanidinio 1 M + TRIS 50 mM p.H 8 (2 h a 4°C), "buffer" fosfato salino (PBS) (NaCl 138mM, KCl 3 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM) 1x + TRIS 50 mM p.H 8 (16 h a 4°C).

Luego, se recolectó el producto de la diálisis, el cual corresponde a la proteína precipitada y se cargó en geles de poliacrilamida al 10% para purificar. Luego de la realización de las electroforesis, se recuperó un trozo de acrilamida que contiene proteína de un peso molecular aparente de 95 kDa, que debe corresponder a la proteína recombinante. Para eluir la proteína se agregó “buffer” de elusión (TRIS pH 7,5 500 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0,1 mM pH 8.0) al trozo de gel y se dejó en agitación constante durante 16 h a 37°C. Las muestras fueron centrifugadas a 1.057 x g por 5 min y luego se extrajo el sobrenadante. Las muestras se lavaron con PBS en filtros amicon (cutoff de 30 k), centrifugando a 3.864 x g por 20 min a 4°C. La proteína purificada se cuantificó, alicuotó y almacenó a -20°C.

## **5.6. Western blot**

Luego de la purificación de VP1r, la muestra se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida -SDS al 10%. Más tarde, se realizó la transferencia de la proteína a una membrana de nitrocelulosa utilizando el equipo eBlot Protein Transfer (GenScript, New Jersey, USA). Posterior a la transferencia, la membrana de nitrocelulosa utilizada se dejó con solución de bloqueo (PBS, Tween al 0,05% y leche descremada al 5%) durante toda la noche a 4°C con agitación. Una vez finalizado el bloqueo, la membrana se incubó con los anticuerpos primarios anti His Tag 1: 3000 (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) y un anticuerpo anti VP1 1: 5000 (GenScript) por 1 h a temperatura ambiente con agitación. Después se realizaron 3 lavados con PBS-Tween al 0,05% y se incubó con los anticuerpo secundario; un anti IgG de ratón acoplado a peroxidasa 1: 10.000 (HRP) (Invitrogen, USA) para el caso de el marcaje con el anticuerpo anti His Tag y un anti IgG de conejo acoplado a HRP 1: 10.000 (KPL) contra el anticuerpo anti VP1. Finalmente, se realizaron 3 lavados con

PBS-Tween y se reveló usando el kit Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific).

## **5.7. Tratamiento de las truchas**

Truchas arcoíris de un peso entre 40 y 50 gramos fueron separadas en 4 grupos diferentes (5 peces por grupo). El grupo 1 correspondió a los peces inyectados con la proteína VP1r (5µg) de IPNV mezclada con adyuvante Montanide; en el grupo 2, los peces fueron inyectados con suero fisiológico (NaCl 0,9%) mezclado con Montanide; en el grupo 3, los peces fueron inyectados con VP1r y suero fisiológico; en el grupo 4 los peces fueron inyectados solo con suero fisiológico.

Las inoculaciones se aplicaron intraperitonealmente (i.p) al día 0, 15 y 30 (Rivas *et al.*, 2012). Se usó como adyuvante Montanide® ISA 763 A VG con el que se prepararon las emulsiones.

Al día 33 se sacrificaron los peces y se realizó la extracción de riñón y bazo.

## **5.8. Extracción de RNA**

Para la extracción de RNA se siguió el protocolo recomendado por Bioline (Canada), con algunas modificaciones. Una porción de cada órgano fueron disgregados en 1 mL de TRIzol® Reagents (ThermoFischer Scientific, USA), utilizando un homogenizador de tejidos (Omni, Kennesaw, GA, USA), luego se agregaron 200 µL de cloroformo y se mezcló con vortex por 30 seg. La mezcla se centrifugó a 13.200 x g por 15 min a 4°C, se rescató la fase acuosa y se traspasó a un tubo nuevo, al cual se le agregó 500 µL de isopropanol 100% frío, mezclándose mediante inversión. Las muestras se dejaron incubando a -20°C por 30 min. Luego de la incubación se centrifugaron a 13.200 x g por 10 min a

4°C y se descartó el sobrenadante. Los “pellets” se lavaron con 500 µL de etanol 75% frío en agua DEPC y se centrifugaron a 6.000 x g por 5 min a 4°C. Finalmente, a los tubos se les retiró cuidadosamente el etanol y se dejaron secar a temperatura ambiente por 5 min. Todas las muestras fueron resuspendidas en 50 µL de agua DEPC y calentadas a 65°C por 10 min y almacenadas a -20°C. La cuantificación de las muestras de RNA se realizó en el espectrofotómetro TECAN NanoQuant infinite m200 pro con el programa iconrol.

### **5.10. Síntesis de cDNA**

Para eliminar cualquier DNA contaminante en las muestras de RNA (2 µg de RNA por cada reacción) se realizó un tratamiento con DNasa libre de RNasa (Promega, USA) según el protocolo que indica el fabricante. A cada muestra se le agregó una mezcla que contenía 1 µL de “buffer” para DNasa 10X (MgCl<sub>2</sub>) y 1µL de DNasa y agua libre de nucleasas tratada con DEPC, hasta tener un volumen final de 10 µL. La mezcla se incubó a 37°C por 30 min. Luego se agregó 1µL de EDTA 25 mM y se incubó a 65°C por 10 min para inactivar la DNasa. Posteriormente, se realizó la síntesis de cDNA con 1 µL de oligo dT 500 ng/µL, 0,5 µL de dNTPs 10 mM (Bioline) 5 µL de “buffer” 5X, 6,5 µL de agua DEPC y 1 µL de transcriptasa reversa M-MLV 200 U/ µL (Promega). La mezcla resultante se incubó a 42°C por una h y después a 70°C por 15 min. El cDNA resultante se almacenó a -20°C.

### **5.11. PCR en tiempo real**

Los reacciones para PCR en tiempo real fueron realizadas en placas de 96 pocillos AXIGEN en el equipo Stratagene mx 3000p (Agilent technology, USA).

Cada reacción de PCR se llevó a un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ , la cual contenía 12,5  $\mu\text{L}$  de kit SensiMix™ SYBR® HI-ROX (Bioline), 1,25  $\mu\text{L}$  de partidor sentido (2  $\mu\text{M}$ ), 1,25  $\mu\text{L}$  de partidor antisentido (2  $\mu\text{M}$ ), 8  $\mu\text{L}$  de agua para PCR y 2  $\mu\text{L}$  de cDNA. Como control se utilizó la expresión del gen normalizador EF1 $\alpha$ . Los resultados fueron expresados con la fórmula  $2^{-(\Delta \text{Ct})}$  (Schmittgen y Livak, 2008).

## **5.12. Aislamiento de células de riñón anterior y bazo**

Células de riñón anterior y bazo fueron obtenidas desde las truchas de los diferentes grupos. Para ello, los órganos fueron disgregados en mallas de 100 mesh con medio IF, que contiene “buffer” fosfato salino pH 7,4 y suero fetal de bovino (SFB) 2%. Para el ensayo de proliferación, se lavaron y resuspendieron en medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 10%, HEPES 15 mM, L-glutamina 4 mM, 2-mercaptoetanol 40  $\mu\text{M}$ , penicilina-estreptomicina 100 UI  $\text{mL}^{-1}$  / 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , gentamicina 50  $\mu\text{g/mL}$ . Dicha suspensión de células se centrifugó a 400 x g por 10 min. El pellet resultante fue resuspendido con medio IF nuevo o RPMI suplementado según sea el caso. Para descartar los eritrocitos presentes en las muestras se realizó lisis osmótica, adicionando a 1 mL de suspensión celular 9 mL de agua miliq, con agitación suave por 20 seg y luego adicionando PBS 10X. Para determinar el número de células se utilizó una cámara de Neubauer y se evaluó viabilidad mediante tinción con azul de tripán.

## **5.13. Análisis por citometría de flujo**

Un total de  $5 \times 10^5$  células por muestra fueron utilizadas para la citometría de flujo y bloqueadas con medio IF. Las células fueron recuperadas por centrifugación a 425 x g por 5 min a 4°C y resuspendidas en 200  $\mu\text{L}$  de medio



IF, que contenía los anticuerpos primarios anti CD4 (anticuerpo policlonal producido en conejo, dilución 1: 400) (Maisey *et al.*, 2016) y anti IgM (I-14, anticuerpo monoclonal, dilución 1: 1.000) (DeLuca *et al.*, 1983), la incubación de los anticuerpos primarios se realizó a 4°C por 20 min. Luego de la incubación con los anticuerpos primarios se realizó un lavado con medio IF y se centrifugó a 425 x g por 5 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet resultante se incubó con los anticuerpos secundarios Alexa fluor 488 donkey anti-rabbit IgG (Life technologies, USA) y Alexa fluor 647 donkey anti-mouse IgG (Life technologies). Una vez terminada la incubación, se realizó un lavado final con IF bajo las mismas condiciones anteriores. Finalmente las muestras fueron resuspendidas en medio IF y traspasadas a tubos de citometría y analizadas en el citómetro de flujo FACS Canto II con el programa FACS Diva versión 6.1.3.

#### **5.14. Ensayo de proliferación antígeno específica**

$3 \times 10^5$  células de riñón y bazo de los peces sometidos con los diferentes tratamientos mencionados anteriormente fueron sembradas en placas de 96 pocillos con fondo redondo con 100  $\mu$ L de medio RPMI suplementado con 5  $\mu$ g de VP1r o con 50  $\mu$ g de OVA. Como control sin estímulo se cultivaron células con el mismo medio suplementado sin VP1r. Estas células fueron incubadas por 72 h a 15°C. Dieciocho h antes de finalizar la incubación, se adicionó 1  $\mu$ L de timidina tritiada 5  $\mu$ Ci/mL (PerkinElmer) a cada pocillo. Posteriormente las células fueron resuspendidas en 800  $\mu$ L de agua miliQ estéril y traspasadas a filtro de fibra de vidrio mediante una cámara de vacío. Los filtros fueron lavados con 1 mL de ácido tricloro acético (TCA) al 1% y 1 mL de etanol 75% y dejándose secar a temperatura ambiente. Los filtros se traspasaron a tubos de centelleo y se adicionó a cada uno 3 mL de líquido de centelleo Ecoscint (National Diagnostics, USA), que contiene nalquileño, alquil fenil etoxilatos lineales y 1-metoxi-2-(2-metoxietoxi) etano. La radioactividad se cuantificó en un

contador de centelleo (Tracor analytic). Los datos obtenidos fueron expresados en cuentas por minuto (CPM).

### **5.15. Análisis estadístico**

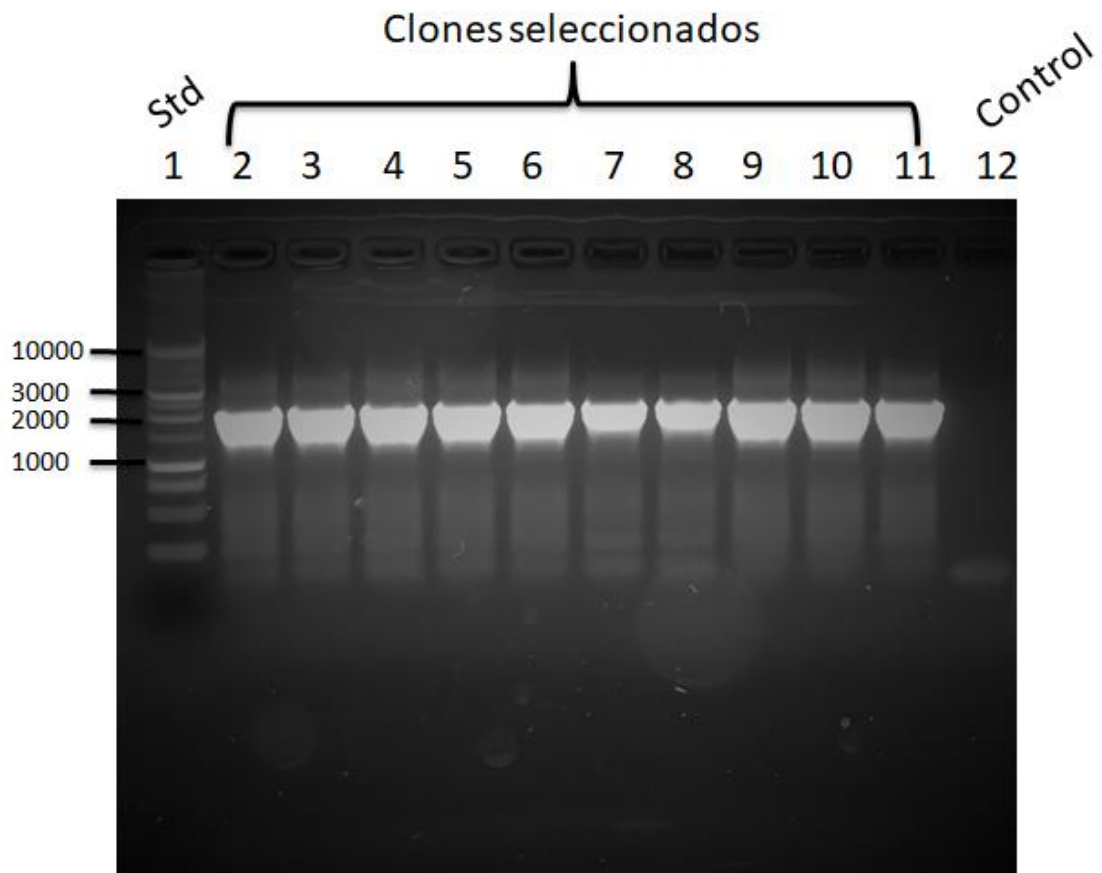
Los resultados fueron analizados a través de un ANOVA no paramétrico (Kruskal Wallis), mediante el programa Graphpad Prisma versión 6.0.

## 6. Resultados

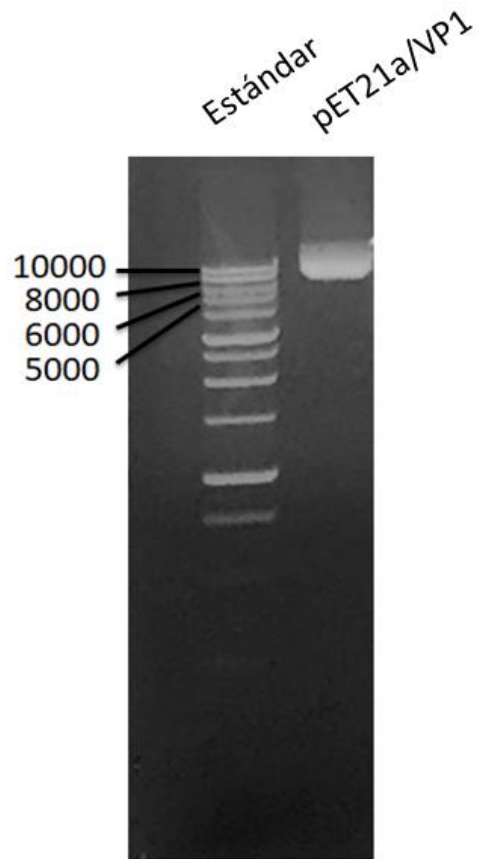
### 6.1. Obtención de la proteína VP1 recombinante

Para obtener la proteína VP1r se utilizó el vector recombinante pET21a/VP1, con el cual se transformaron *E. coli* Nova Blue. El resultado del análisis de las bacterias transformantes mediante PCR de colonias se muestra en la figura 1. El producto de la amplificación con los partidores de VP1 (Tabla 1) corresponde a un fragmento cercano a los 2000 pb (Figura 1) que es el tamaño esperado para el amplicón. En la figura 2, se muestra el análisis de una transformante de *E. coli* BL21 (DE3) que se obtuvo para expresar y purificar la proteína VP1r.

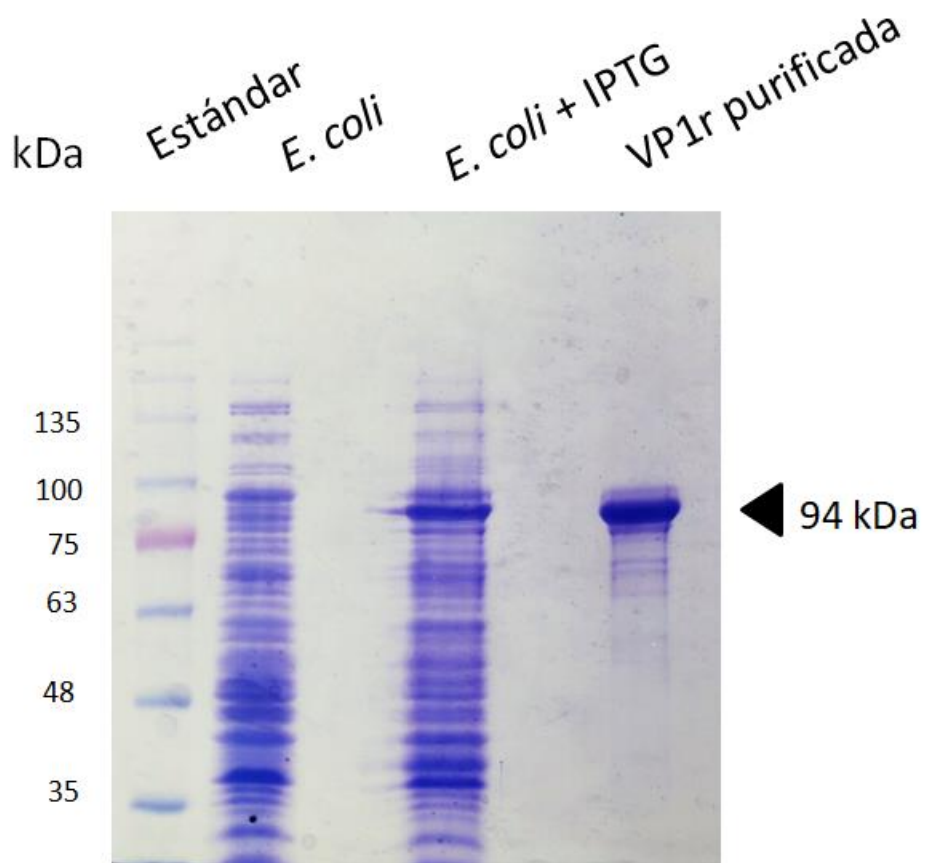
En la figura 3, se muestra una electroforesis de los extractos proteicos de bacterias *E. coli* BL21 (DE3) transformantes estimuladas con IPTG. El producto de la inducción de la expresión de VP1r clonado es una proteína de alrededor de 95 KDa, que corresponde al tamaño esperado para VP1r. La proteína producida fue purificada desde cuerpos de inclusión de las bacterias transformantes y el resultado se muestra en la figura 3. El rendimiento promedio de la purificación fue de 0.41 mg por litro de cultivo de bacterias transformadas. Para determinar que la proteína purificada era VP1r, se realizó un western blot con un anticuerpo anti His-tag y un anti VP1. El anticuerpo anti-VP1 es un anticuerpo policlonal producido contra un péptido sintético de 15 aminoácidos de la proteína (CSFDPKARPQTPRSP) (GenScript). Los resultados muestran que la banda de 94 kDa es inmunoreactiva con los dos anticuerpos (Figura 4) lo que verifica que esta proteína corresponde a VP1r.



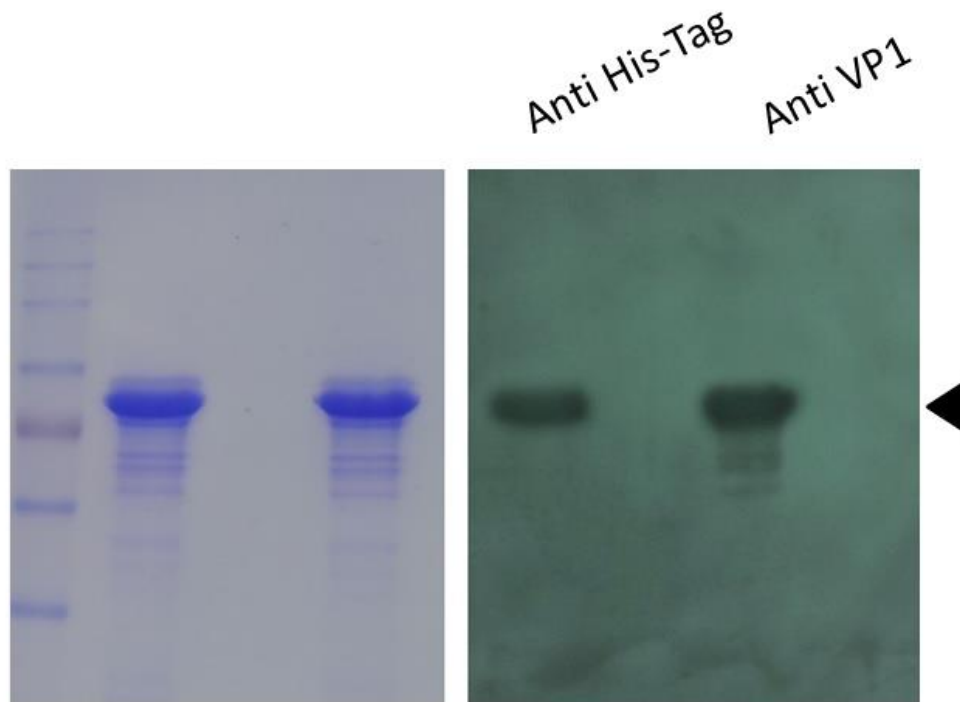
**Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de PCR de colonias realizado en *E. coli* Nova Blue transformadas con el vector pET21a/VP1. Carril 1: estándar de peso molecular (GeneRuler DNA ladder 1kb (Thermo Scientific), carriles 2 al 11: clones seleccionados. Carril 12: control negativo del PCR.**



**Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa del vector pET21a/VP1 aislado de una *E. coli* NovaBlue transformante.** Estándar de peso molecular (GeneRuler DNA ladder 1kb (Thermo Scientific)). pET21a/VP1 purificado desde una transformante.



**Figura 3. Extractos totales de *E. coli* BL21 (DE3) separados por SDS-PAGE.** Estándar: AccuRuler RGB Plus Prestained Protein Ladder (Maestrogen). VP1r: proteína recombinante purificada de los extractos de proteínas de bacterias inducidas con IPTG.



**Figura 4. Análisis de la proteína recombinante purificada mediante Western Blot.** Anti His-tag: banda inmunoreactiva detectada con anti His- y con anti mouse IgG conjugado con HRP. Anti VP1: banda inmunoreactiva visualizada con anti VP1 como anticuerpo primario y con anti rabbit IgG conjugado con HRP. En ambos casos se usó kit Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) para revelar.

## **6.2. Diseño experimental**

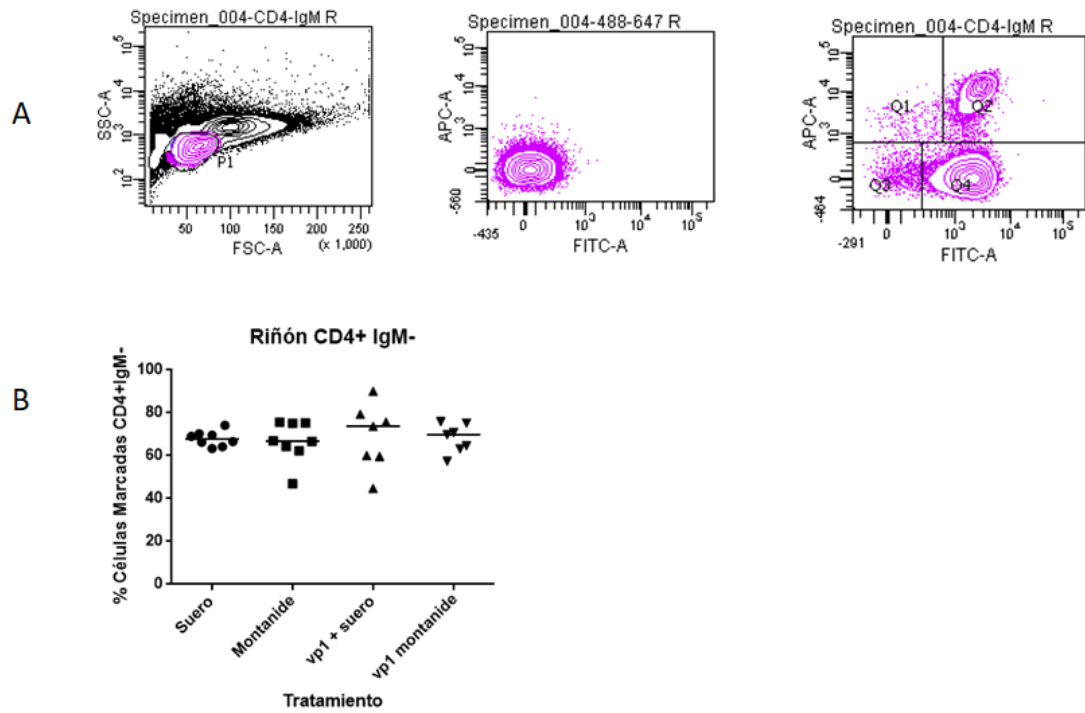
Para caracterizar el tipo de respuesta inmune que se produce en la trucha arcoíris por estimulación con la proteína VP1r, un grupo de truchas fue inmunizado con VP1r más Montanide, otro con VP1r más suero fisiológico, un grupo control que recibió montanide y el otro solo suero. Se realizaron 3 inyecciones i.p; a los días 0, 15 y 30.

## **6.3. Análisis de poblaciones respondedoras mediante citometría de flujo**

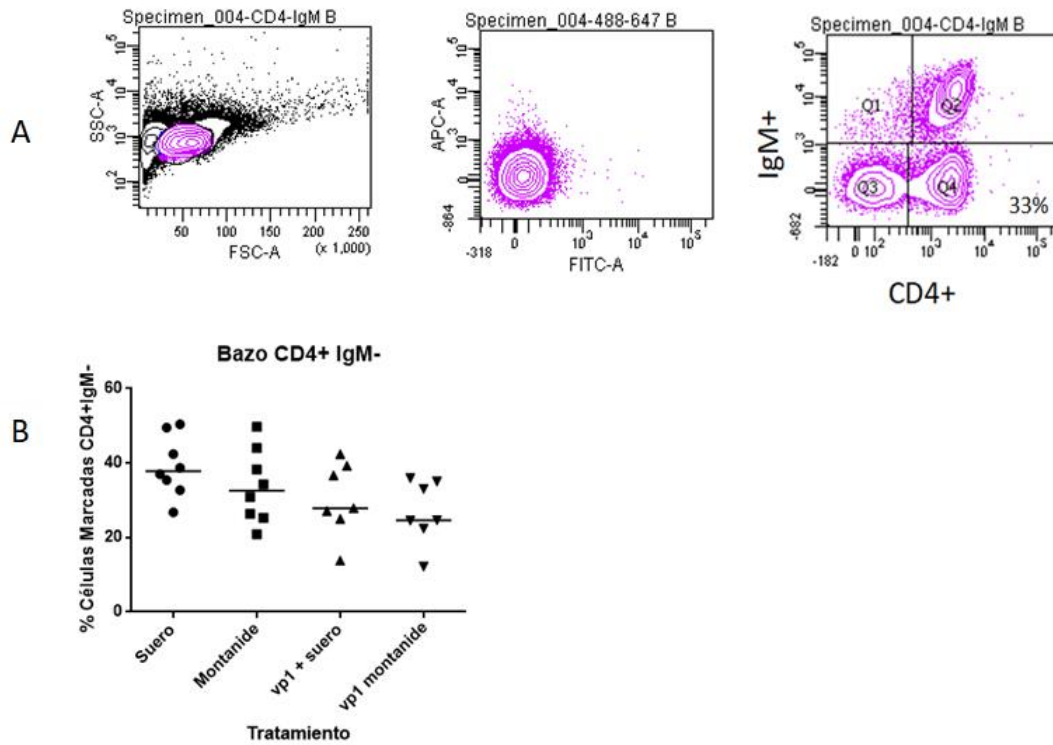
Para determinar si se produjeron cambios en la población de linfocitos CD4+ en el riñón y bazo de cada grupo de tratamiento, se identificaron y cuantificaron los linfocitos, usando el anticuerpo anti CD4 y anti IgM. Las células marcadas fueron analizadas en el citómetro de flujo y los resultados obtenidos se muestran en las figuras 5 y 6. En la parte superior de la figura se muestra uno de los análisis representativos de las poblaciones celulares de bazo (Figura 6), donde las poblaciones analizadas, CD4+IgM-, corresponde a linfocitos T y la población IgM+ corresponde a linfocitos B. Los linfocitos T representan un 33% de la población identificada como linfocitos según tamaño (FSC) y granulosidad (SSC), mientras que los linfocitos B corresponden a un 46,3 %. El análisis de los porcentajes de células linfocitarias en los grupos experimentales no mostró diferencias estadísticamente significativas en los linfocitos T ni en los linfocitos B de riñón de truchas tratadas con la proteína VP1 en comparación con los controles (Figuras 5 y 6). En el bazo tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de linfocitos de las truchas inmunizadas con la proteína VP1r en comparación con los controles. Estos resultados muestran



que la inmunización con VP1 no induce un cambio significativo en el porcentaje de linfocitos T CD4+ y linfocitos B IgM+ de riñón y bazo de truchas tratadas.



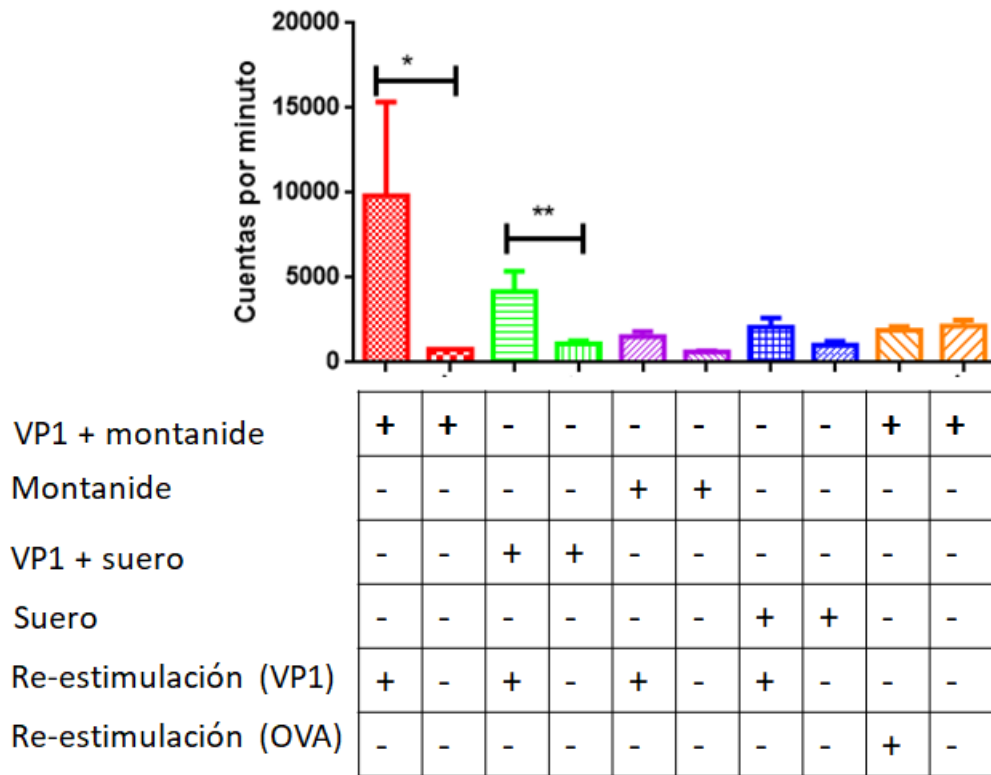
**Figura 5. Poblaciones de linfocitos T CD4+IgM- de riñón por citometría de flujo.** A. Izquierda: análisis FSC/SSC de las poblaciones leucocitarias del riñón de la trucha, el gate marcado representan las células linfoides. Centro: control de anticuerpos secundarios. Derecha: doble marcaje con anticuerpos anti IgM (I-14) y anticuerpo policlonal anti CD4. B. Porcentajes de poblaciones CD4+ IgM- de riñón analizadas mediante citometría de flujo. Los datos representan los porcentajes de células marcadas en cada uno de los tratamientos. ANOVA no paramétrico (Kruskal Wallis) entre el grupo control y los tratamientos (\*P < 0,05).



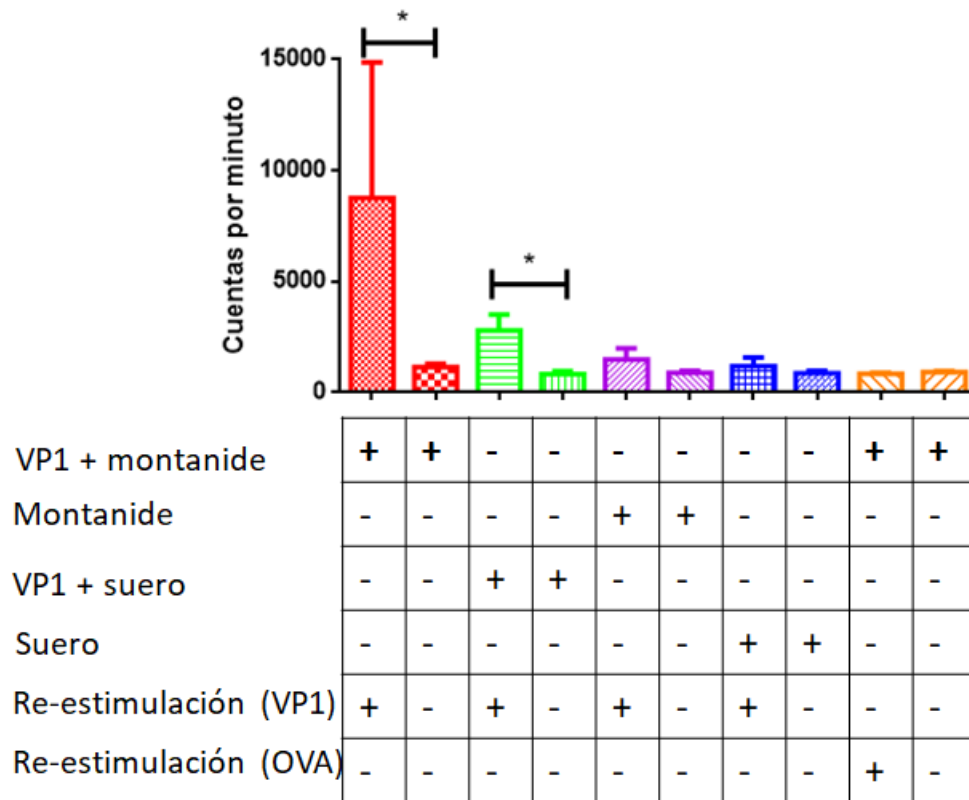
**Figura 6. Poblaciones de linfocitos T CD4+IgM- de bazo por citometría de flujo.** A. Izquierda: análisis FSC/SSC de las poblaciones leucocitarias del bazo de la trucha, el gate marcado representan las células linfoides. Centro: control de anticuerpos secundarios. Derecha: doble marcaje con anticuerpos anti IgM (I-14) y anticuerpo policlonal anti CD4. B. Porcentajes de poblaciones CD4+ IgM- bazo analizadas mediante citometría de flujo. Los datos representan los porcentajes de células marcadas en cada uno de los tratamientos. ANOVA no paramétrico (Kruskal Wallis) entre el grupo control y los tratamientos (\*P < 0,05).

#### **6.4. Ensayo de proliferación antígeno específico inmunizados con VP1r**

Para determinar si la inmunización con VP1r produce proliferación de los linfocitos, se cuantificó la proliferación antígeno-específica, tanto de células de riñón como de bazo de peces tratados y controles. La cuantificación se realizó mediante la incorporación de timidina tritiada. Los resultados se muestran en las figuras 7 y 8. Se observó un aumento de las CPM en el caso de las células aisladas del riñón de los peces del grupo tratado con VP1r y montanide respecto al control, así como también del grupo inmunizado solo con VP1r (Figura 7). De la misma manera en el bazo, VP1r más montanide y VP1r en suero fisiológico, mostraron un aumento en las CPM cuando las células son re-estimuladas *in vitro*, no hubo cambio en los otros grupos controles (Figura 8). Estos resultados sugieren que VP1r induce proliferación de linfocitos específicos. Para corroborar que la proliferación fue antígeno-específica, un grupo de truchas fueron inmunizadas con VP1r y montanide y fueron re-estimuladas *in vitro* con ovalbúmina (OVA), no observándose diferencias en las CPM entre el grupo estimulado *in vitro* y su respectivo control sin estimular (Figuras 7 y 8).



**Figura 7. Proliferación antígeno-específica de células de riñón de trucha arcoíris con diferentes tratamientos.** Leucocitos provenientes de peces inmunizados por 72 horas con VP1r o con OVA. La proliferación se midió mediante incorporación de timidina tritiada ( $^3\text{H}$ ). Cada valor representa el valor el promedio de 5 peces en duplicado. Los resultados están representados en cuentas por minuto. ANOVA no paramétrico (Kruskal Wallis) entre el grupo control y los tratamientos (\* $P < 0,05$ ).

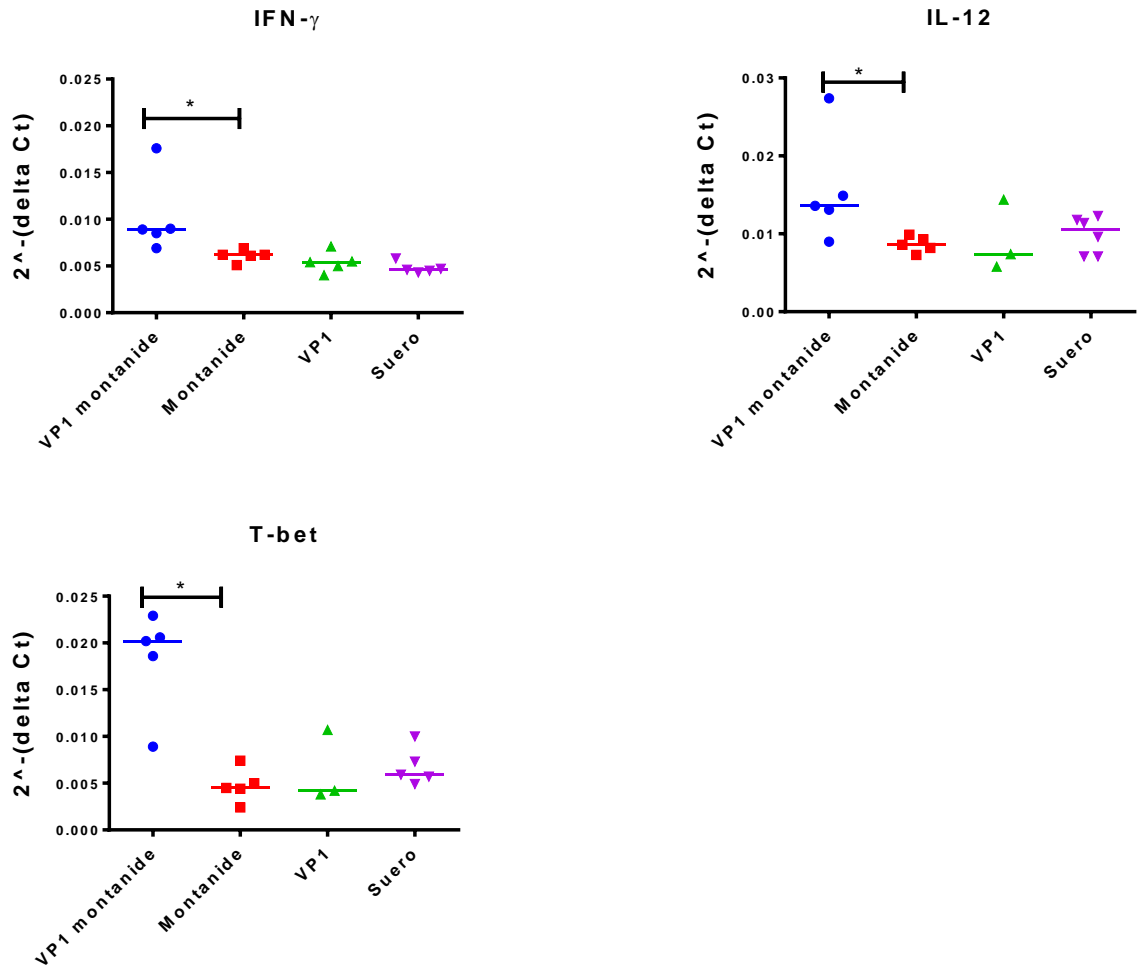


**Figura 8. Proliferación antígeno-específica de esplenocitos de trucha arcoíris con diferentes tratamientos.** Leucocitos provenientes de peces inmunizados por 72 horas con VP1r o con OVA. La proliferación se midió mediante incorporación de timidina tritiada ( $^3\text{H}$ ). Cada valor representa el valor el promedio de 5 peces en duplicado. Los resultados están representados en cuentas por minuto. ANOVA no paramétrico (Kruskal Wallis) entre el grupo control y los tratamientos (\* $P < 0,05$ ).

## **6.5. Análisis de la expresión de citoquinas en los peces tratados**

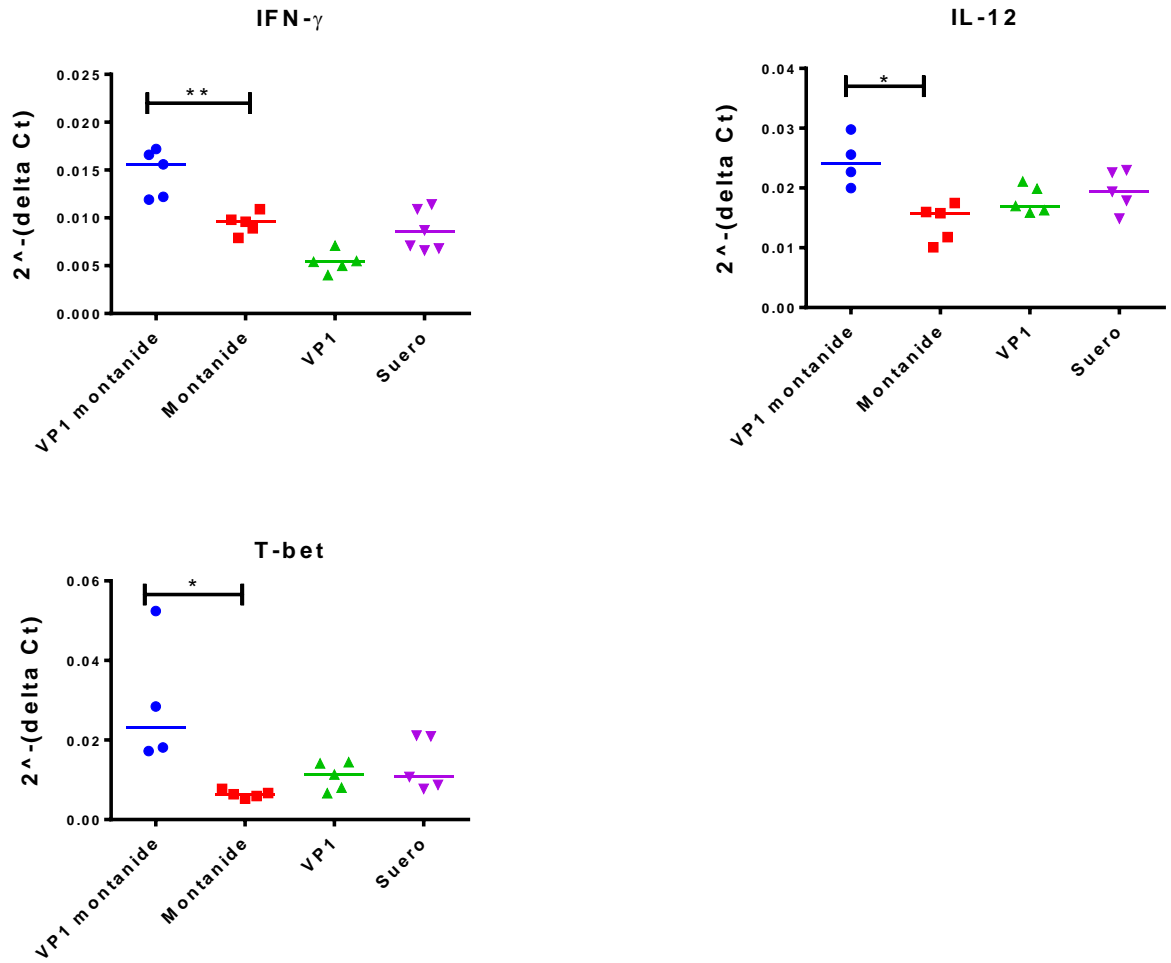
Con el objetivo de estudiar el tipo de respuesta inmune que es capaz de inducir la proteína VP1r se escogió examinar la expresión de los genes de IFN $\gamma$ , IL-12 y T-bet como genes característicos de la respuesta Th1, IL-4/13A, y GATA-3 como marcadores característicos de la respuesta Th2. El resultado de la expresión transcriptómica de estos genes analizados en los diferentes grupos experimentales se muestra en las figuras 9 a la 12.

En el riñón aislado de los peces inyectados con VP1r y montanide se indujo un aumento de transcritos de las citoquinas IFN $\gamma$ , IL-12 y t-bet respecto al grupo control (peces inyectados con montanide). En tanto, la expresión en el riñón de los peces inyectados con VP1r disuelto en suero fisiológico y los inyectados únicamente con montanide no arrojó diferencias significativas (figura 9). En el bazo, la proteína VP1r en montanide aumentó la expresión IFN- $\gamma$ , e IL-12 (figura 10). Los resultados indican que la proteína VP1r de IPNV indujo un aumento de la expresión transcriptómica de las citoquinas de la respuesta tipo Th1 tanto en el riñón como en el bazo de las truchas tratadas. De manera similar, en el riñón se produjo un aumento significativo de del gen IL-4/13A en peces tratados con VP1r más montanide comparado a su control (Figura 11), VP1r por sí sola (sin adyuvante) también generó un aumento de IL-4/13A, pero no de GATA-3. En el bazo, los resultados fueron similares a los obtenidos en el riñón, es decir, VP1r administrado con montanide indujo un aumento de la expresión de IL-4/13A, aunque no hubo un aumento significativo de los niveles de GATA-3 (Figura 12). VP1r sin adyuvante igual indujo un aumento de los transcritos de IL-4/13 A. Estos resultados muestran que la proteína VP1r recombinante del virus IPNV administrada en las truchas produce un aumento de la expresión transcriptómica de la citoquina característica de la respuesta tipo Th2 tanto en riñón como en el bazo de las truchas tratadas.

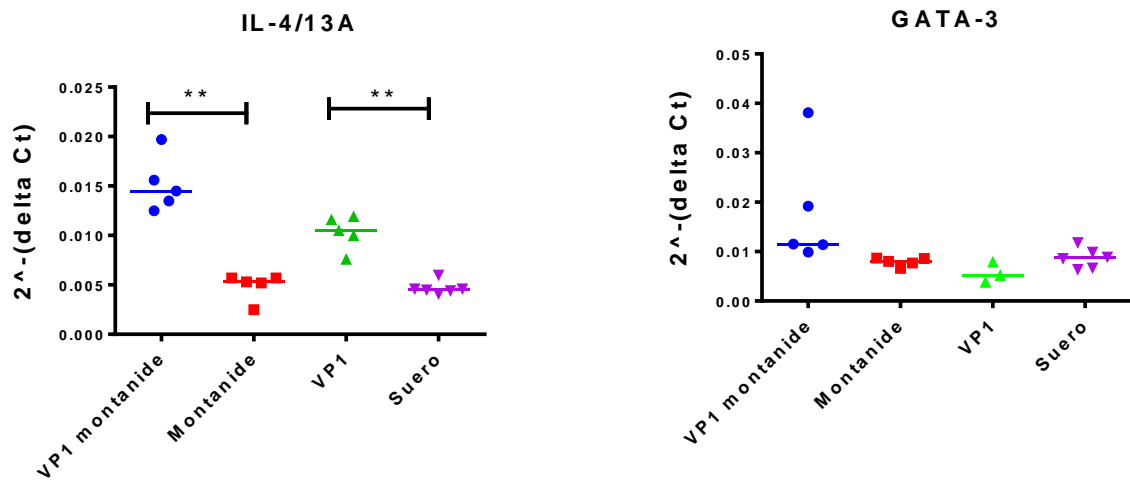


**Figura 9. Niveles de transcritos de genes marcadores de respuesta Th1 en el riñón de truchas arcoíris.** La expresión de los transcritos se realizó mediante qRT-PCR 72 h después de la última inmunización. Los resultados están expresados en  $2^{-(\text{delta Ct})}$ . Las diferencias estadísticas se determinaron mediante un ANOVA no paramétrico (Kruskal Wallis) entre el grupo control y los tratamientos (\* $P < 0,05$ ).

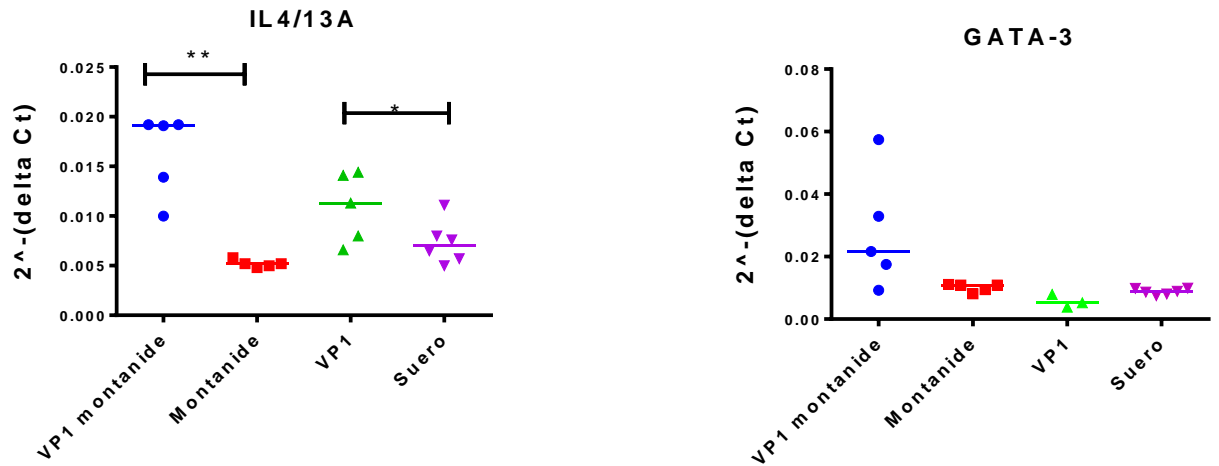




**Figura 10. Niveles de transcritos de genes marcadores de respuesta Th1 en el bazo de truchas arcoíris.** La expresión de los transcritos se realizó mediante qRT-PCR 72 h después de la última inmunización. Los resultados están expresados en  $2^{-(\text{delta Ct})}$ . Las diferencias estadísticas se determinaron mediante un ANOVA no paramétrico (Kruskal Wallis) entre el grupo control y los tratamientos. (\* $P < 0,05$ ).



**Figura 11. Niveles de transcritos de genes marcadores de respuesta Th2 en el riñón de truchas arcoíris.** La expresión de los transcritos se realizó mediante qRT-PCR 72 h después de la última inmunización. Los resultados están expresados en  $2^{-\Delta Ct}$ . Las diferencias estadísticas se determinaron mediante un ANOVA no paramétrico (Kruskal Wallis) entre el grupo control y los tratamientos. (\* $P < 0,05$ ).



**Figura 12. Niveles de transcritos de genes marcadores de respuesta Th2 en el bazo de Truchas arcoíris.** La expresión de los transcritos se realizó mediante qRT-PCR 72 h después de la última inmunización. Los resultados están expresados en  $2^{-(\Delta Ct)}$ . Las diferencias estadísticas se determinaron mediante un ANOVA no paramétrico (Kruskal Wallis) entre el grupo control y los tratamientos. ( $P < 0,05$ ).

## 7. Discusión

En este trabajo demostramos que la proteína VP1r de IPNV es una proteína inmunogénica en trucha arcoíris. VP1r generó proliferación linfocitaria antígeno-específica y un aumento en la expresión de transcritos tanto de Th1 (IFN $\gamma$  y T-bet) como de Th2 (IL-4/13A) en relación al grupo control.

La detección de la proliferación de linfocitos T inducida por el antígeno es considerada el sello que caracteriza la activación linfocitaria. Como en los mamíferos, se piensa que los linfocitos T de los peces se pueden activar por el reconocimiento del antígeno y que éstos proliferan y se diferencian, aunque no se sabe si se producen subpoblaciones T helper separadas en este evento. De hecho, no hay muchas evidencias de que los linfocitos T de los peces proliferen en respuesta al antígeno. Algunos reportes han sido realizados en gimbuna (Toda *et al.*, 2011), y en ellos se concluye que luego de la re-estimulación con ovalbúmina los linfocitos T CD4+ fueron capaces de proliferar. Nosotros hemos observado también proliferación de linfocitos T, en respuesta a la estimulación con ovalbúmina (Maisey *et al.*, 2016). En ese caso, se observó que luego de inmunizar truchas con ovalbúmina, los linfocitos T proliferaron luego de ser re-estimulados *in vitro*. En otros trabajos también se ha logrado estudiar la proliferación leucocitaria mediante la estimulación *in vitro* con concanavalina A (ConA) (Sizemore *et al.*, 1984), y cuyos resultados mostraron que células IgM-en presencia de macrófagos y ConA, fueron capaces de proliferar.

En este estudio hemos evaluado la respuesta de los linfocitos T de la trucha contra VP1r midiendo la proliferación en los peces respondedores por la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina. Como la frecuencia de precursores respondedores para un antígeno particular es baja *in vivo*, la detección de la respuesta mediante esta técnica requiere de re-estimulación *in vitro*. Los resultados mostraron que efectivamente hay en los peces inmunizados linfocitos

respondedores y dicho de otra manera, VP1r es en este sentido una proteína inmunogénica para la trucha ya que induce proliferación linfocitaria al ser administrada intraperitonealmente a los peces.

Aunque la técnica de incorporación de <sup>3</sup>H-timidina es muy sensible, tiene limitaciones ya que no es posible distinguir la población linfocitaria respondedora. Por esta razón, quisimos determinar mediante citometría de flujo si se observaban cambios en la población linfocitaria CD4+, que en las truchas debiera corresponder a los linfocitos T helper (Maisey *et al.*, 2016). Dado que se observó proliferación, nosotros esperábamos que los porcentajes de linfocitos marcados fueran mayores en el grupo tratado con la proteína recombinante, al ser los linfocitos T CD4+, una de las principales poblaciones linfocitarias respondedoras. Sin embargo, la citometría de flujo no mostró cambios apreciables en los porcentajes de linfocitos T CD4+ de trucha cuando esas son inmunizadas con VP1r. Es importante recalcar que este análisis fue realizado en porcentajes de células positivas respecto a la población linfocitaria total, por lo que un aumento de igual proporción en la población linfocitaria podría enmascarar el efecto. Es recomendable realizar un análisis cuantitativo para verificar los resultados obtenidos o contar con otros anticuerpos marcadores de las poblaciones linfocitarias T CD8 y CD3, y marcadores de células mieloides. Estos últimos análisis deberán esperar el desarrollo de los anticuerpos contra este tipo de marcadores o la disponibilidad a través de colaboraciones en el caso de que estos existan (Fischer *et al.*, 2003; Korystar *et al.*, 2013)

La estandarización de otras técnicas para medir proliferación linfocitaria en trucha arcoiris como la marcación con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE), que se analiza mediante citometría de flujo, permitiría detectar simultáneamente el marcador de linfocitos y la proliferación de una población en particular (Dalgaard *et al.*, 2010). La técnica de detección de proliferación mediante CFSE ha sido exitosamente utilizada diferentes especies de peces (Toda *et al.*, 2009; Hohn y Petrie-Hanson, 2012; Nunez-Ortiz

*et al.*, 2014). Poder medir la proliferación linfocitaria en respuesta al reconocimiento antigénico, en conjunto con la marcación de las subpoblaciones es sin duda una interesante posibilidad de estudiar la inmunidad mediada por células en los peces teleosteos, cuyo conocimiento se ha visto retrasado por la falta de herramientas, principalmente anticuerpos contra los diferentes componentes y marcadores del sistema inmune.

Aunque no se identificó si la población linfocitaria respondedora a VP1r era la correspondiente a las células T CD4+, sí se observó un aumento en la expresión transcripcional de los genes IFN $\gamma$ , T-bet, e IL-4/13A que son producidos por esta población celular en los órganos linfoides de las truchas estimuladas.

IFN $\gamma$ , citoquina de la respuesta Th1 y el factor de transcripción T-bet fueron inducidos frente a la estimulación con VP1r en las truchas arcoíris. En trucha arcoíris se ha logrado identificar y caracterizar IFN $\gamma$ , ya que se logró inducir un incremento en la producción de óxido nítrico, intermediarios reactivos del oxígeno y la expresión de transcritos de los genes de MHC II en células de la línea RTS-11 luego de la estimulación con esta citoquina (Zou *et al.*, 2005). En lo que respecta a su propiedades antivirales, se ha descrito que es capaz de inducir actividad antiviral tanto sobre el virus IPNV como en alfa virus (SAV) cuando se utilizan líneas celulares (Sun *et al.*, 2011). T-bet es uno de los factores de transcripción más característico de los linfocitos Th1. En trucha arcoíris ya se ha descrito, y se ha observado que cuando se infectan truchas con *Tetracapsuloides bryosalmonae* existe un aumento en la expresión tanto de parte de IFN $\gamma$  como de T-bet, dando a entender que este factor estaría implicado en la respuesta Th1 (Wang *et al.*, 2010). En otro trabajo, se separaron pronefrocitos de truchas arcoíris mediante cell sorting y se evaluaron distintos marcadores moleculares por RT-PCR. En las células CD8+ se observó la expresión del factor T-bet en conjunto con Eomes a y b, siendo estos dos últimos marcadores de linfocitos T CD8+, las cuales han sido descritas en

trucha arcoíris (Fischer *et al.*, 2003; Takizawa *et al.*, 2011). Como se ha descrito anteriormente, IFN $\gamma$  tiene efectos similares a los descritos en vertebrados superiores, por lo que a pesar de que no se demostró directamente que se esté produciendo y secretando esta citoquina, el aumento de los transcritos de IFN $\gamma$  y T-bet sugieren que VP1r sería capaz de generar un efecto sobre los linfocitos Th, promoviendo una respuesta tipo Th1.

Es probable que la población T CD4 $^{+}$  sea la población respondedora como ocurre en mamíferos, lo que puede ser demostrado aislando estas células mediante sorting y analizando el perfil transcripcional en ellas. Para ello se requiere separar la población de linfocitos T CD4 $^{+}$  CD3 $^{+}$  respondedora, analizando en ella la expresión de IFN $\gamma$  y de T-bet para determinar la diferenciación a linfocitos Th1.

En relación a la IL-12, otra citoquina característica de la respuesta Th1, pero producida por células mieloides (Zou y Secombes, 2016), sólo se observó un aumento de la expresión transcripcional en riñón anterior y no en bazo. Esta citoquina se compone de dos subunidades (p35 y p40). En trucha, se han descrito dos variantes de esta citoquina; la p35/p40b y p35/p40c (Wang *et al.*, 2014). Se describe una expresión diferencial de los genes codificantes de las subunidades de IL-12 de trucha, siendo p40c junto a p35 los que se expresan mayoritariamente en los órganos inmunes (Wang *et al.*, 2014). Se ha observado que cuando se estimulan células de riñón anterior con rIL-12, los niveles de expresión de IFN $\gamma$  aumentan luego de 6 h post estimulación. En este estudio los partidores detectan los transcritos de la subunidad p40c. Como hemos visto, los efectos de IL-12 en peces teleósteos comparten muchas similitudes a las evidenciadas en vertebrados superiores, y en consecuencia nuestros resultados sugieren que VP1r es capaz de inducir probablemente en los macrófagos del riñón de las truchas la expresión de IL-12, potenciando la respuesta tipo Th1 entre otras funciones inmunes.

A pesar de que no se demostró la producción y secreción de las citoquinas IFN $\gamma$  e IL-12 por la falta de anticuerpos necesarios para esta evaluación, el aumento de la expresión transcripcional de estas citoquinas y de T-bet ante el desafío de las truchas con VP1r indica que se produce con este antígeno una respuesta tipo Th1. Esto podría también correlacionarse con la activación de macrófagos productores de IL-12 y probablemente de linfocitos T CD8+, que son responsables de la respuesta celular antiviral en los vertebrados superiores (Murali-Krishna *et al.*, 1998), y también probablemente en peces.

Por otro lado también se observó un aumento de IL-4/13A, marcador de Th2, en el riñón y bazo de las truchas inmunizadas con VP1r. En peces se han descrito dos formas de la IL-4/13 (A y B). En esta tesis se ha evaluado la expresión transcripcional de IL-4/13A, ya que esta isoforma ha sido la más estudiada en trucha arcoíris y es la que posee una mejor expresión basal en varios tejidos y linfocitos B, mientras que la isoforma IL-4/13B posee una expresión menor en los distintos tejidos y no se encuentra en linfocitos B. IL-4/13B está presente en macrófagos de la línea RTS-11, en macrófagos primarios y en células de riñón anterior (Wang *et al.*, 2016). Se ha demostrado que IL-4/13A es capaz de inducir por ejemplo aumento en los linfocitos B IgZ-2+ (Hu *et al.*, 2010) e IgM+ (Zhu *et al.*, 2012) en sangre periférica. En vertebrados superiores los linfocitos B son capaces de producir un mayor número de isotipos de inmunoglobulinas y se producen mediante el cambio de isotipos (Coffman *et al.*, 1993). La interleuquina 4 juega un papel importante en este fenómeno. En los peces no existe el cambio de isotipos ya que los genes de IgM, IgT e IgD están codificados en diferentes cromosomas (Warren, 1995), por lo que no se sabe si la IL-4/13 tiene alguna relación con la presencia de uno u otro isotipo. Por lo tanto, los antecedentes sugieren que VP1r podría producir un aumento de los niveles tanto de IgM como de IgZ a través del aumento en la expresión de IL-4/13 A, hecho que podría también evaluarse en nuestros experimentos. IL-4/13 A podría también favorecer un aumento en la capacidad fagocítica o en la



expresión de sus propios receptores como hemos observado en nuestro laboratorio (Imarai, comunicación personal).

Aunque nosotros creemos que en el aumento de transcritos propios de una respuesta tipo Th1 y Th2 participan los linfocitos T CD4+ de la trucha, no se puede descartar que existan otros tipos celulares capaces de producir las citoquinas y factores de transcripción aquí estudiados. En vertebrados superiores, existen células de la respuesta inmune innata con características que las asemejan a los linfocitos T helper, denominadas ILC (células linfoides innatas), las cuales pertenecen al linaje linfoide y que al igual que los linfocitos T helper se divide en distintos grupos. El grupo 1 responde a IL-12, puede expresar el factor T-bet de forma constitutiva y produce tanto IFN $\gamma$  como TNF. El grupo 2 expresa constitutivamente altos niveles de GATA-3 y produce citoquinas reguladoras como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Ambos grupos tienen bastantes similitudes con los subtipos linfocitarios Th1 y Th2 respectivamente, sin embargo las ILC no tienen una respuesta antígeno-específica, debido a que carecen de TcR (Sonnenber y Artis, 2015). En peces hasta el momento no se han descrito estos tipos celulares, por lo que es tarea de futuros trabajos indagar si están presentes, ya que los peces teleósteos al ser un grupo evolutivamente más antiguo que los mamíferos, tienen una respuesta inmune innata bien desarrollada.

Finalmente, los resultados de esta tesis indican que la proteína VP1r de IPNV es capaz de inducir una respuesta tanto tipo Th1 como Th2, siendo esta la primera vez que se analizan estas propiedades para esta proteína.

## 8. Conclusiones

Los resultados de la re-estimulación antigénica *in vitro* indican que la proteína VP1r de IPNV induce en el riñón y bazo de la trucha arcoíris proliferación antígeno-específica y sugiere la activación de una respuesta mediada por linfocitos.

La proteína VP1r de IPNV induce una respuesta tipo Th1 y Th2 en la trucha arcoíris.

## 9. Bibliografía

**ABBAS, A.; MURPHY, K.; SHER, A.** 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 383:787-793.

**BALLESTEROS, N.; RODRIGUEZ, S.; PEREZ-PRieto, S.; COLL, J.** 2012. Trout oval VP2 DNA vaccination mimics transcriptional responses occurring after infection with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Fish Shellfish Immunol*. 33:1249-1257.

**BILLIAU, A.; MATTHYS, P.** 2009. Interferon- $\gamma$ : A historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev*. 20:97-113.

**CHI, H.; ZHANG, Z.; INAMI, M.; BØWALD, J.; ZHAN, W.; DALMO, R.** 2012. Molecular characterizations and functional assessments of GATA-3 and its splice variant in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Dev Comp Immunol*. 36:491-501.

**COFFMAN, R.; LEBMAN, D.; ROTHMAN, P.** 1993. Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Adv Immunol*. 54:229-270.

**COFFMAN, R.; OHARA, J.; BOND, M.; CARTY, J.; ZLOTNIK, A.; PAUL, W.** 1986. B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *J. Immunol*. 136:4538-4541.

**COUSE, J.; KALINKE, U.; OXENIUS, A.** 2015. Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons. *Nature Rev Immunol*. 15:231-242.

**DADAR, M.; MEMARI, H.; VAKHARIA, V.; PEYGHAN, R.; SHAPOURI, M.; MOHAMMADIAN, T.; HASANZADEH, R.; GHASEMI, M.** 2015. Protective and immunogenic effects of *Escherichia coli*-expressed infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) VP2-Vp3 fusion protein in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol*. 47:390-396.

**DALGAARD, T.; NORUP, L.; RUBBENSTROTH, WATTRANG, E.; JUUL-MADSEN, H.** 2010. Flow cytometric assessment of antigen-specific proliferation in peripheral chicken T cells by CFSE dilution. *Vet Immunol Immunopathol*. 138:85-94.

**DAVIES, K.; MCCOLL, K.; WANG, L.; YU, M.; WILLIAMS, L.; CRANE, M.** 2010. Molecular characterization of Australian isolates of aquatic birnaviruses. *Dis Aquat Org*. 93:1-15.

**DELUCA, D.; WILSON, M.; WARR, G.** 1983. Lymphocyte heterogeneity in the trout, *Salmo gairdneri*, defined with monoclonal antibodies to IgM. Eur J. Immunol. 13: 546-551.

**DOBOS, P.** 1995. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). Annu Rev Fish Dis. 5: 25-54.

**DOBOS, P.** 1977. Virus-specific protein synthesis in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. J Virol. 21: 242-258.

**DUNCAN, R.; MASON, C.; NAGY, E.; LEONG, J.; DOBOS, P.** 1991. Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus genome segment B and its encode VP1 protein: A putative RNA-dependent RNA polymerase lacking the Gly-Asp-Asp motif. Virol. 181: 541-552.

**DUNCAN, R.; NAGY, E.; KRELL, J.; DOBOS, P.** 1987. Synthesis of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein, detection of a virus-encoded protease, and the structure mapping of genome segment A coding regions. J Virol. 61: 3655-3664.

**FISCHER, U.; UKTE, K.; DIJKSTRA, J.; KOLLNER, B.** 2003. Adaptive cell-mediated cytotoxicity against allogenic targets by CD8-positive lymphocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Dev. Comp. Immunol. 27:323-337.

**FORLENZA, M.; MAGEZ, S.; SCHARSACK, J.; WESTPHAL, A.; SAVELKHOUL, H.; WIEGERTJES, G.** 2009. Receptor-mediated and lectin-like activities of carp (*Cyprinus carpio*) TNFalpha. J. Immunol. 183:5319-5332.

**FRAUNHOFER.** 2014. Comunicado de prensa. [en línea]. <[http://www.fraunhofer.cl/content/dam/chile/es/documents/Comunicado\\_AquaSur\\_2014\\_esp.pdf](http://www.fraunhofer.cl/content/dam/chile/es/documents/Comunicado_AquaSur_2014_esp.pdf)> [consulta: 17-08-2015].

**FROST, P.; NESS, A.** 1997. Vaccination of Atlantic salmon with recombinant vp2 of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), added to a multivalent vaccine, suppress viral replication following IPNV challenge. Fish Shellfish Immunol. 7:609-619.

**GASCAN, H.; GAUCHAT, J.; RONCAROLO, M.; YSSEL, H.; SPITS, H.; DE VRIES, J.** 1991. Human B cell clones can be induced to proliferate and to switch to IgE and IgG4 synthesis by interleukin 4 and a signal provided by activated CD4+ T cell clones. J Exp Med. 173:747-750.

**GORDON, S.** 2002. Alternative activation of macrophages. *Nature Rev Immunol.* 3:23-35.

**GRAHAM, S.; SARIN, L.; BAHAR, M.; MYERS, R.; STUART, D.; BAMFORD, D.; GRIMES, J.** 2011. Pancreatic necrosis virus is the determinant of genome attachment. *Plos Pathogens.* 7: 1-11.

**GRAYFER, L.; GARCIA, E.; BELOSEVIC, M.** 2010. Comparison of macrophage antimicrobial responses induced by type II interferons of the goldfish (*Carassius auratus L.*). *J Biol Chem.* 285:23537-23547.

**GRAYFER, L.; WALSH, J.; BELOSEVIC, M.** 2007. Characterization and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus L.*) tumor necrosis factor-alpha. *Dev Comp Immunol* 2007. 32:532-543.

**GREEN, M.; SAMBROOK, J.** 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual.* 4<sup>th</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA. 2001 p.

**HILL, B.; WAY, K.** 1995. Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic birnaviruses. *Annu Rev Fish Dis.* 5:55-77.

**HOHN, C.; PETRIE-HANSON, L.** 2012. Rag1<sup>-/-</sup> mutant zebrafish demonstrate specific protection following bacterial re-exposure. *PlosOne.* 7:e44451.

**HU, Y.; XIANG, L.; SHAO, J.** 2010. Identification and characterization of a novel immunoglobulin Z isotype in zebrafish: implications for a distinct B cell. *Mol Immunol.* 4: 738-746.

**IGAWA, D.; SAKAI, M.; SAVAN, R.** 2006. An unexpected discovery of two interferon gamma-like genes along with interleukin (IL)-22 and -26 from teleost: IL-22 and -26 genes have been described for the first time outside mammals. *Mol Immunol.* 43:999-1009.

**KLEIN, L.; KYWESKI, B.; ALLEN, P.; HOGQUIST, K.** 2014. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nature Rev Immunol.* 14: 377-392.

**KORSTAR, T.; THI, H.; TAKIZWA, F.; KOLLNER, B.** 2013. A multicolour flow cytometry identifying defined leukocyte subsets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 35:2017-2019.

**KUMARI, J.; BOGWALD, J.; DALMO, R.** 2009. Transcription factor GATA-3 in Atlantic salmon (*Salmo salar*): molecular characterization, promoter activity and expression analysis. *Mol Immunol.* 46:3099-3107.

**LAING, K.; WANG, T.; ZOU, J.; HOLLAND, J.; HONG, S.; BOLS, N.; SECOMBES, C.** 2001. Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* tumour necrosis factor-alpha. Eur J Biochem. 268:1315-1322.

**LAUKSUND, S.; TOLLERSRUD, L.; CHANG, C.; ROBERTSEN, B.** 2015. Infectious pancreatic necrosis virus proteins VP2, VP3 and VP5 antagonize IFN $\alpha$ 1 promoter activation while VP1 induces IFN $\alpha$ 1. Virus Res. 196: 113-121.

**LEVICAN, J.; MIRANDA-CARDENAS, C.; SOTO-RIFO, R.; AGUAYO, F.; GAGGERO, C.; LEON, O.** 2017. Infectious pancreatic necrosis virus enters CHSE-214 cells via macropinocytosis. Scientific Reports. 7(3068):1-12.

**LIEW, F.** 2002. Th1 and Th2 cells: a historical perspective. Nature Rev Immunol. 2:55-60.

**LIN, A.; XIANG, L.; WANG, Q.; DONG, W.; GONG, Y.; SHAO, J.** 2009 The DC-SIGN of zebrafish: insights into the existence of a CD209 homologue in a lower vertebrate and its involvement in adaptive immunity. J. Immunol. 183: 7398-7410.

**LOPEZ, A.; BEGLEY, C.; WILLIAMSON, D.; WARREN, D.; VADAS, M.; SANDERSON, C.** 1986. Murine eosinophil differentiation factor: An eosinophil-specific colony stimulating factor with activity for human cells. J Exp Med. 163:1085-1089.

**MACDONALD, R.; DOBOS, P.** 1981. Identification of the proteins encoded by each genome segment of infectious pancreatic necrosis virus. Virol. 114: 414-422.

**MAISEY, K.; MONTERO, R.; CORRIPIO-MIYAR, Y.; TORO-ASCUY, D.; VALENZUELA, B. REYES-CERPA, S.; SANDINO, A.; ZOU, J.; WANG, T.; SECOMBES, C.; IMARAI, M.** 2016. Isolation and characterization of salmonid CD4+ T cells. J. Immunol. 196:4150-4163.

**MARTIN, S.; ZOU, J.; HOULIHAN, D.; SECOMBES, C.** 2007. Directional responses following recombinant cytokine stimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) RTS-11 macrophage cells as revealed by transcriptome profiling. BMC Genomics. 8:150.

**MILEV-MILOVANOVIC, I.; LONG, S.; WILSON, M.; BENG TEN, E.; MILLER, N.; CHINCHAR, V.** 2006. Identification and expression analysis of interferon gamma genes in channel catfish. *Immunogenetics*. 58:70-80.

**MITRA, S.; ALNABULSI, A.; SECOMBES, C.; BIRD, S.** 2010. Identification and characterization of the transcription factors involved in T-cell development, t-bet, stat6 and foxp3, within the zebrafish, *Danio rerio*. *FEBS J*. 277:128-147.

**MORENO, P.; OLVEIRA, J.; LABELLA, A.; CUTRIN, J.; BARO, J.; BORREGO, J.; DOPAZO, C.** 2014. Surveillance of viruses in wild fish populations in areas around the Gulf of Cadiz (South Atlantic Iberian Peninsula). *Appl Environ Microbiol*. 80: 6560-6571.

**MUNANG'ANDU, H.; FREDRIKSEN, N.; MUTOLOKI, S.; DALMO, R.; EVENSEN, Ø.** 2013a. The kinetics of CD4+ and CD8 T-cell expression correlate with protection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) vaccinated against infectious pancreatic necrosis. *Vaccine*. 31: 1956-1963.

**MUNANG'ANDU, H.; SANDTRØ.; MUTOLOKI, S.; BRUDESETH, B.; EVENSEN, Ø.** 2013b. Immunogenicity and cross protective ability of the central VP2 amino acids of infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *PlosOne*. 8:e54263.

**MURALI-KRISHNA, K.; ALTMAN, J.; SURESH, M.; SOURDIVE, D.; ZAJAC, A.; SLANSKY, J.; AHMED, R.** 1998. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity*. 8:177-187.

**MURRAY, E.; TERRES, G.; MACATONIA, S.; HSIEH, C.; MATSON, J.; LANIER, L.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, M.; MURPHY, K.; O'GARRA, A.** 1994. B7 and IL-12 cooperate for proliferation and IFN $\gamma$  production by mouse T helper clones that are unresponsive to b7 costimulation. *J Exp Med*. 180:223-231.

**NEAVE, B.; RODAWAY, A.; WILSON, S.; PATIENT, R.; HOLDER, N.** 1995. Expression of zebrafish GATA3 (*gta3*) during astrulation and neurulation suggests a role in the specification of cell fate. *Mech Dev*. 51:169-182.

**NUNEZ-ORTIZ, N.; GERDOL, M.; STOCCHI, V.; MAROZZI, C.; RANDELLI, E.; BERNINI, C.; BUONOCORE, F.; PICCHIETTI, S.; PAPESCHI, C.; SOOD, N.; PALLAVICINI, A.; SCAPIGLIATI, G.** 2014. T cell transcripts and T cell activities in the gills of the teleost fish sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Dev Comp Immunol*. 47:309-318.

**OHTANI, M.; HAYASHI, N.; HASHIMOTO, K.; NAKANISHI, T.; DIJSKSTRA, J.** 2008. Comprehensive clarification of two paralogous interleukin 4/13 loci in teleost fish. *Immunogenetics*. 60:383-397.

**ORDAS, M.; COSAT, M.; ROCA, F.; LOPEZ-CASTEJON, G.; MULERO, V.; MESEGUER, J.; FIGUERAS, A.; NOVOA, B.** 2007. Turbot TNF-alpha gene: molecular characterization and biological activity of the recombinant protein. *Mol Immunol*. 44:389-400.

**ORTEGA, C.; ENRÍQUEZ, R.** 2007. Factores asociados a la infección celular por el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV). *Arch. Med. Vet.* 39:7-18.

**OSWALD I.; GAZZINELLI, R.; SHER, A.; JAMES, S.** 1992. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity. *J. Immunol.* 148:3578-3582.

**OYARZUN, A.** 2014. Estudio de la participación de VP1 del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) de salmón en el apagamiento de la síntesis de proteínas celulares. Tesis Título Bioquímico. Santiago, Chile. U. de Santiago. Fac. Química y Biología.

**PAUL, W.; ZHU, J.** 2010. How are Th2-type immune responses initiated and amplified?. *Nature Rev Immunol*. 10:225-235.

**PERNIS, A.; ROTHMAN, P.** 2002. JAK-STAT signaling in asthma. *J Clin Invest*. 109:1279-1283.

**READ, E.; RODAWAY, A.; NEAVE, B.; BRANDON, N.; HOLDER, N.; PATIENT, R.; WALMSLEY, M.** 1998. Evidence for non-axial A/P patterning in the nonneural ectoderm of *Xenopus* and zebrafish pregastrula embryos. *Int J Dev. Biol.* 42:763-774.

**REYES-CERPA, S.; REYES-LOPEZ, F.; TORO-ASCUY, D.; MONTERO, R.; MAISEY, K.; ACUÑA-CASTILLO, K.; SUNYER, J.; PARRA, D.; SANDINO, A.; IMARAI, M.** 2014. Induction of anti-inflammatory cytokine expression by IPNV in persistent infection. *Fish Shellfish Immunol*. 41: 172-182.

**RIVAS-ARAVENA, A.; CORTEZ-SAN MARTIN, M.; GALAZ, J.; IMARAI, M.; MIRANDA, D.; SPENCER, E.; SANDINO, A.M.** 2012. Evaluation of the immune response against immature viral particles of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV): a new model to develop an attenuated vaccine. *Vaccine*. 30:5110-5117.



**ROBERTSEN, B.** 2006. The interferon system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.* 20:172-191.

**ROCA, F.; MULERO, I.; LOPEZ-MUÑOZ, A.; SEPULCRE, M.; RENSHAW, S.; MESEGUER, J.; MULERO, V.** 2008. Evolution of the inflammatory response in vertebrates: fish TNF-alpha is a powerful activator of endothelial cells but hardly activates phagocytes. *J. Immunol.* 181:5071-5081.

**SAEJI, J.; STET, R.; VRIES, B.; VAN MUISWINKEL, W.; WIEGERTJES, G.** 2003. Molecular and functional characterization of carp TNF: a link between TNF polymorphism and trypanotolerance?. *Dev. Comp. Immunol.* 27:29-41.

**SALGADO-MIRANDA, C.; ROJAS-ANAYA, E.; GARCÍA-ESPINOZA, G.; LOZA-RUBIO, E.** 2014. Molecular characterization of the VP2 gene of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) isolates from Mexico. *J. Aquat. Anim. Health.* 26:43-51.

**SANDERSON, C.; O´GARRA, A.; WARREN, D.; KLAUS, G.** 1986. Eosinophil differentiation factor also has B-cell growth factor activity: Proposed name interleukin 4. *Immunol.* 83:437-440.

**SANTI, .; SANDTRØ, A.; SINDRE, H.; SONG, H.; HONG, J.; THU, B.; WU, J.; VAKHARIA, V.; EVENSEN, Ø.** 2005. Infectious pancreatic necrosis induces apoptosis in vitro and in vivo independent of VP5 expression. *Virology.* 342:13-25.

**SAVAN, R.; KONO, T.; IGAWA, D.; SAKAI, M.** 2005 A novel tumor necrosis factor (TNF) gene present in tandem with the TNF-alpha gene on the same chromosome in teleosts. *Immunogenetics.* 57:140-150.

**SAVAN, R.; SAKAI, M.** 2004. Presence of multiple isoforms of TNF alpha in carp (*Cyprinus carpio L.*): genomic and expression analysis. *Fish Shellfish Immunol.* 17:87-94.

**SCMITTGEN, T.; LIVAK, K.** 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. *Nature Protocols.* 3:1101-1108.

**SCOTT, K.; MAGYAR, G.; KYUNG CHUNG, H.; DOBOS, P.** 1997. Incomplete dsRNA genomes purified infectious pancreatic necrosis Virus *Virology.* 239:62-70.

**SERNAPESCA.** 2016. Informe sanitario de salmonicultura en centros marinos.

**SHWED, P.; DOBOS, P.; CAMERON, L.; VAKHARIA, V.; DUNCAN, R.** 2002. Birnavirus VP1 proteins form a distinct subgroup of RNA-dependent RNA polymerases lacking of GDD motif. *Virology.* 296:241-250.

- SIZEMORE, R.; MILLER, N.; CUCHENS, M.; LOBB, C.; CLEM, J.** 1984. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the cellular requirements for in vitro mitogenic responses of channel catfish leukocytes. *J. Immunol.* 133:2920-2924.
- SOMMERSET, I.; KROSSØY, B.; BIERING, E.; FROST, P.** 2005. Vaccines for aquaculture. *Expert Rev Vac.* 4:89-101.
- SOMMOGYI, P.; DOBOS, P.** 1980. Virus-specific RNA synthesis in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.* 33:129-139.
- SONNENBERG, G.; ARTIS, D.** 2015. Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nat Med.* 21:698-708.
- STOLTE, E.; SAVELKOUL, H.; WIEGERTJES, G.; FLIK, G.; LIDY VERBURG-VAN KEMENADE, B.** 2008. Differential expression of two interferon-gamma genes in common carp (*Cyprinus carpio L.*). *Dev Comp Immunol.* 32:1467-1481.
- SUN, B.; SKJAEVELAND, I.; SVINGERUD, T.; ZOU, J.; JØRGENSEN, J.; ROBERTSEN, B.** Antiviral activity of salmonid gamma interferon against infectious pancreatic necrosis virus and salmonid alphavirus and its dependency on type I interferon. *J Virol.* 85:9188-9198.
- SZABO, S.; KIM, S.; COSTA, G.; ZHANG, X.; GARRISON, C.; GLIMCHER, L.** 2000. A novel transcription factor, t-bet directs Th1 lineage commitment. *Cell.* 100:655-669.
- TAKIZAWA, F.; DIJSKTRA, J.; KOTTERBA, P.; KORYTAR, T.; KOCK, H.; KOLLNER, B.; JAUREGUIBERRY, B.; NAKANISHI, T.; FISCHER, U.** 2011. The expression of CD8 $\alpha$  discriminates distinct T cell subsets in teleost fish. *Dev Comp Immunol.* 35:752-763.
- TAKIZAWA, F.; ARAKI, K.; KOBAYASHI, I.; MORITOMO, T.; OTOTAKE, M.; NAKANISHI, T.** 2008a. Molecular cloning and expression analysis of T-bet in ginbuna crucian carp (*Carassius auratus langsdorfii*). *Mol. Immunol.* 45:127-136.
- TAKIZAWA, F.; MIZUNAGA, Y.; ARAKI, K.; MORITOMO, T.; OTOTAKE, M.; NAKANISHI, T.** 2008b. GATA3 mRNA in ginbuna crucian carp (*Carassius auratus langsdorfii*): cDNA cloning, splice variants and expression analysis. *Dev. Comp. Immunol.* 32:898-907.
- TODA, H.; SAITO, Y.; KOIKE, T.; TAKIZAWA, F.; ARAKI, K.; YABU, T.; SOMAMOTO, T.; SUETAKE, H.; SUZUKI, Y.; OTOTAKE, M.; MORITOMO, T.; NAKANISHI T.** 2011. Conservation of characteristics and functions of CD4 lymphocytes in a teleost fish. *Dev. Comp. Immunol.* 35:650-660.

**TODA, H.; SHIBASAKI, Y.; KOIKE T.; OHTANI, M.; TAKISAWA, F.; OTOTAKE, M.; MORITOMO, T.; NAKANISHI, T.** 2009. Alloantigen-specific killing is mediated by CD8-positive T cells in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 33:646-652.

**WANG, T.; JOHANSSON, P.; ABOS, B.; HOLT, A.; TAFALLA, C.; JIANG, Y.; WANG, A.; QIAOQING, X.; HUANG, W.; COSTA, M.; DIAZ-ROSALES, P.; HOLLAND, J.; SECOMBES, C.** 2016. First in-depth analysis of the novel th2-type cytokines in salmonid fish reveals distinct patterns of expression and modulation but overlapping bioactivities. *Oncotarget.* 7:10917-10946.

**WANG, T.; HUSAIN, M.; HONG, S.; HOLLAND, J.** 2014. Differential expression, modulation and bioactivity of distinct fish IL-12 isoforms: Implications towards the evolution of Th1-like responses. *Eur. J. Immunol.* 44:1542-1551.

**WANG, T.; SECOMBES, C.** 2013. The cytokine networks of adaptive immunity in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 35:1703-1718.

**WANG, L.; SHANG, N.; FENG, H.; GUO, Q.; DAI, H.** 2012. Molecular cloning of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) T-bet and GATA-3, and their expression profiles with IFN- $\gamma$  in response to grass carp reovirus (GCRV) infection. *Fish Physiol Biochem.* 39:793-805.

**WANG, T.; HOLLAND, J.; MARTIN, S.; SECOMBES, C.** 2010. Sequence and expression analysis of two T helper master transcription factors, T-bet and GATA3, in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and analysis of their expression during bacterial and parasitic infection. *Fish Shellfish Immunol.* 29:705-715.

**WARREN, G.** 1995. Immunoglobulins genes of fish. *Dev. Comp. Immunol.* 19:1-12.

**VEGA, L.; MONTES DE OCA, R.; VALLADARES, B.; MARTINES CASTANEDA, S.; ALONSO, U.; ENRIQUEZ, R.; ORTEGA, C.** 2011. Evaluación de la respuesta clínico-patológica e inmune humoral en crías de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) experimentalmente infectadas con Infección Pancreática Necrótica Virus (IPNV). *Arch Med Vet.* 43:27-34.

**VITETTA, E.; OHARA, J.; MYERS, C.; LAYTON, J.; KRAMMER, P.; PAUL, W.** 1985. Serological, biochemical, and functional identity of B cell-stimulatory factor 1 and B cell differentiation factor for IgG1. *J. Exp. Med.* 162:1726-1731.

**YOSHIURA, Y.; KIRYU, I.; FUJIRAWA, A.; SUETAKE, H.; SUZUKI, Y.; NAKANISHI, T.** 2003. Identification and characterization of fugu orthologues of mammalian interleukin-12 subunits. *Immunogenetics*. 55:296-306.

**ZHENG, W.; FLAVELL, R.** 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*. 89:587-596.

**ZHU, L.; PAN, P.; FANG, W.; SHAO, J.; XIANG, L.** 2012. Essential role of IL-4R $\alpha$  in interaction in adaptive immunity of zebrafish: Insight into the origin of Th2-like regulatory mechanisms in ancient vertebrates. *J. Immunol.* 188:5571-5584.

**ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W.** 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Ann. Rev. Immunol.* 28:445-489.

**ZOU, J.; SECOMBES, C.** 2016. The function of fish cytokines. *Biology*. 5:1-35.

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

**ZOU, J.; CARRINGTON, A.; COLLET, B.; DIJKSTRA, J.; , YOSHIURA, Y.; BOLS, N.; SECOMBES, C.** 2005. Identification and bioactivities of IFN-gamma in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: the first Th1-type cytokine characterized functionally in fish. *J. Immunol.* 175:2484-2494.

**ZOU, J.; YOSHIURA, Y.; DIJKSTRA, J.; SAKAI, M.; OTOTAKE, M.; SECOMBES, C.** 2004. Identification of an interferon gamma homologue in fugu, *Takifugu rubripes*. *Fish Shellfish Immunol.* 17:403-409.

**ZOU, J.; WANG, T.; HIRONO, I.; AOKI, T.; INAGAWA, H.; HONDA, T.; ELLIS, A.; SECOMBES, C.** 2002. Differential expression of two tumor necrosis factor genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev. Comp. Immunol.* 26:161-172.

**ZOU, J.; PEDDIE, S.; SCAPIGLIATI, G.; ZHANG, Y.; BOLS, N.; ELLIS, A.; SECOMBES, C.** 2003. Functional characterisation of the recombinant tumor necrosis factors in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev. Comp. Immunol.* 27:813-822.